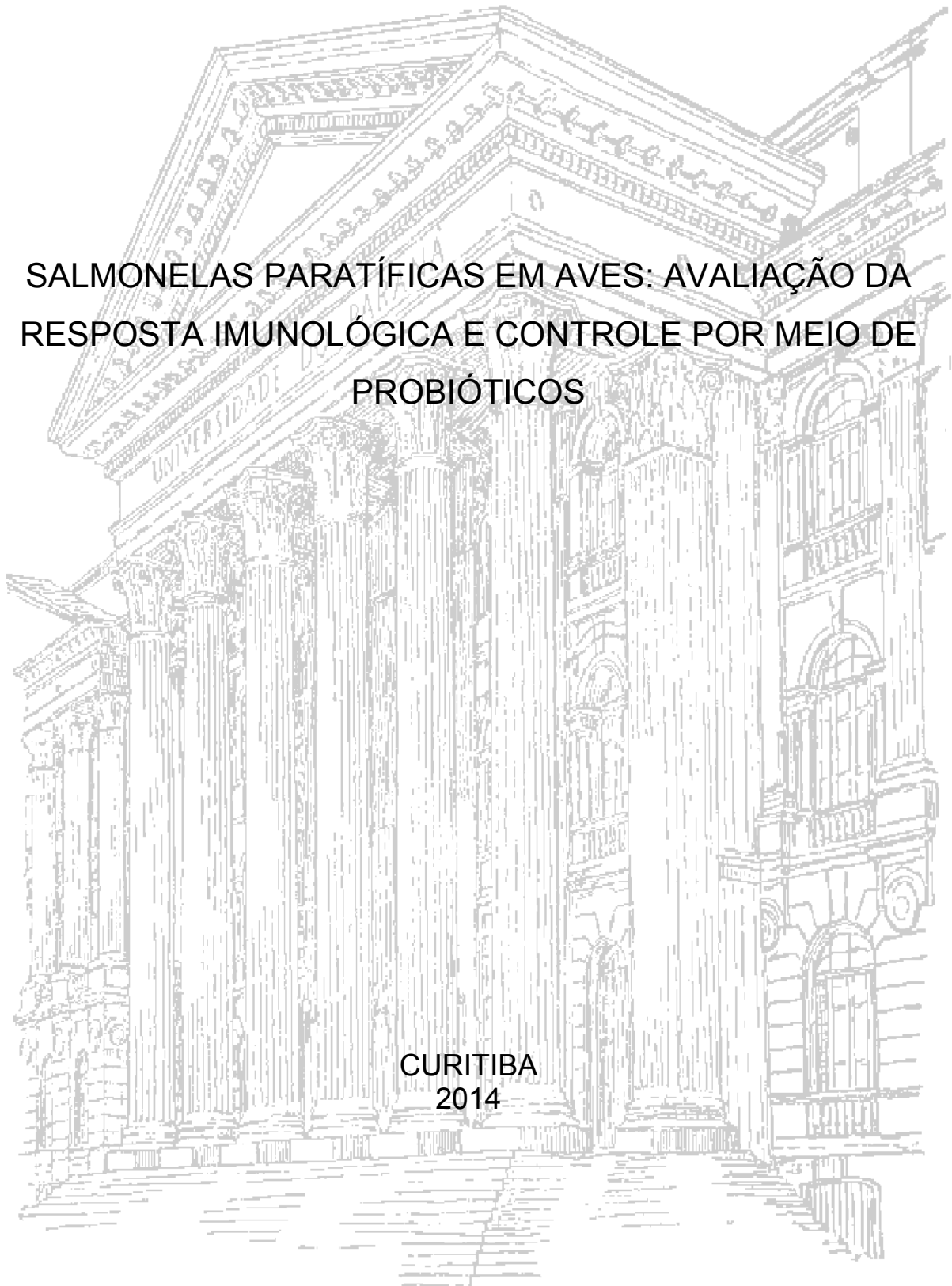


EDUARDO CORREA MUNIZ

SALMONELAS PARATÍFICAS EM AVES: AVALIAÇÃO DA  
RESPOSTA IMUNOLÓGICA E CONTROLE POR MEIO DE  
PROBIÓTICOS

CURITIBA  
2014



EDUARDO CORREA MUNIZ

# SALMONELAS PARATÍFICAS EM AVES: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA E CONTROLE POR MEIO DE PROBIÓTICOS

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Santin

CURITIBA  
2014

M966 Muniz, Eduardo Correa

Salmonelas paratíficas em aves: avaliação da resposta  
imunológica e controle por meio de probióticos. / Eduardo Correa  
Muniz. – Curitiba : 2014  
98 f. il.

Orientadora: Elizabeth Santin

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias – Patologia veterinária.

1. Frango de corte - Alimentação e rações. 2. Frango de corte –  
Doenças. 3. Patologia veterinária. I. Santin, Elizabeth.  
II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Patologia  
veterinária. III. Título

CDU 619.6

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Tese intitulada "*Salmonella paratificas* EM AVES: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA E CONTROLE POR MEIO DE PROBIÓTICOS" apresentada pelo Doutorando **EDUARDO CORREA MUNIZ** declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou o candidato Apolo para receber o Título de Doutor em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 14 de março de 2014

Professora Dra. Elizabeth Santin  
Presidente/Orientadora

Professor Dr. Luiz Felipe Caron  
Membro

Dr. Mário Sérgio Assayag  
Membro

Dr. Alberto Back  
Membro

Dr. Ivomar Oldoni  
Membro

*Dedico meu trabalho às três coisas que mais amo na vida: minha família, meus amigos e meu país.*

*Dedico também a todos os Veterinários que trabalham na nobre função de produzir alimentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Paraná por apoiar este trabalho aproximando a pesquisa das necessidades do campo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Santin, pela maestria como me orientou sabendo me guiar, ensinar e permitindo meu desenvolvimento profissional.

Aos amigos do LABMOR, que auxiliaram imensamente na condução dos experimentos, dos artigos científicos e desta tese.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Caron por servir de exemplo sempre motivando, desafiando e fazendo os alunos pensarem.

À minha família pela compreensão durante o período que estive ausente envolvido nos trabalhos da pós-graduação.

À Seara Alimentos e à Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda pelo apoio incondicional durante a realização deste curso de pós-graduação.

Todas as pessoas e entidades aqui mencionadas foram fundamentais para a realização deste curso de pós-graduação.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>ix</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>x</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xi</b>
<b>Introdução Geral.....</b>	<b>12</b>
<b>Capítulo 1 - Avaliação da resposta imunológica da mucosa intestinal de frangos de corte desafiados com diferentes sorovares de <i>Salmonella</i>.....</b>	<b>21</b>
Resumo.....	22
Abstract.....	23
Introdução.....	24
Material e métodos.....	25
Resultados.....	30
Discussão.....	36
Referências.....	41
<b>Capítulo 2 - Avaliação de diferentes probióticos na ração para controle de <i>Salmonella</i> Minnesota em frangos de corte.....</b>	<b>45</b>
Resumo.....	46
Abstract.....	47
Introdução.....	48
Material e métodos.....	50
Resultados.....	54
Discussão.....	57
Conclusões.....	60
Referências.....	61

<b>Estudo de caso - Presença de <i>Salmonella</i> spp. em cama reutilizada de frangos de corte.....</b>	<b>64</b>
Resumo.....	65
Abstract.....	66
Introdução.....	67
Material e Métodos.....	68
Resultados.....	71
Discussão.....	71
Referências.....	74
<b>Considerações finais.....</b>	<b>77</b>
<b>Vita.....</b>	<b>79</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>84</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Descrição da fórmula antigênica dos diferentes sorovares de <i>Salmonella</i> utilizadas na inoculação experimental dos distintos tratamentos.....	27
<b>Tabela 2.</b> Peso médio e ganho de peso diário das aves, erro padrão nos diferentes tratamentos ao primeiro e 20 dias de idade.....	31
<b>Tabela 3.</b> Taxa de retenção de nutrientes nos diferentes tratamentos. ....	31
<b>Tabela 4.</b> Média e erro padrão da contagem de <i>Salmonella</i> em suabes de cloaca realizados nos diferentes tratamentos 48h após a inoculação.....	32
<b>Tabela 5.</b> Média e erro padrão da contagem de <i>Salmonella</i> nos diferentes tratamentos em papo e ceco aos 14 e 20 dias de idade das aves.....	32
<b>Tabela 6.</b> Média da contagem de células CD8+, CD4+, caliciformes e macrófagos no intestino das aves dos diferentes tratamentos aos 14 e 20 dias de idade.....	33
<b>Tabela 7.</b> Descrição dos tratamentos.....	50
<b>Tabela 8.</b> Média e desvio padrão da contagem de colônias de <i>Salmonella</i> em suabe cloacal 48h após inoculação, papo e ceco de frangos de corte aos 35 dias de idade nos diferentes tratamentos .....	55
<b>Tabela 9.</b> Contagem (média e desvio padrão) de células caliciformes, CD4+, CD8+ e relação CD4+:CD8+ por campo em íleo e ceco de frangos de corte aos 7 dias de idade nos diferentes tratamentos. ....	56
<b>Tabela 10.</b> Contagem (média e desvio padrão) de células caliciformes, CD4+, CD8+ e relação CD4+:CD8+ por campo no íleo e ceco de frangos de corte aos 35 dias de idade.....	56
<b>Tabela 11.</b> Número de amostras positivas e negativas para <i>Salmonella</i> em camas novas e reutilizadas.....	71

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fotomicrografia dos cecos das aves com 20 dias de vida demonstrando as células caliciformes coradas presentes na mucosa intestinal (Imunoistoquímica, 40X).....	34
<b>Figura 2.</b> Fotomicrografia dos cecos de aves com 20 dias de vida demonstrando as células CD8+ coradas presentes no intestino (Imunoistoquímica, 40 X).....	34
<b>Figura 3.</b> Fotomicrografia dos cecos das aves com 35 dias de vida demonstrando as células CD4+ coradas presentes no intestino (Imunoistoquímica, 40X).....	55
<b>Figura 4.</b> Processo de fermentação da cama. ....	69

## RESUMO

As salmoneloses estão entre as principais doenças das aves comerciais sendo que sua presença em plantéis avícolas é responsável por perdas econômicas e por riscos relacionados à saúde pública. A *Salmonella* está ligada às aves desde o início da história da produção avícola e sua epidemiologia e controle são extremamente complexos, dependendo de inúmeras variáveis como o sorovar, hospedeiro, o ambiente e também características geográficas. Várias são as ferramentas utilizadas para controlar salmoneloses em frangos de corte, mas em especial, nos últimos anos, tem se destacado a busca de uma boa modulação da microbiota intestinal como forma de evitar que este microrganismo se mantenha nos plantéis. Tentando melhor compreender estes aspectos, foi desenvolvida a presente tese com o objetivo de avaliar o comportamento clínico e imunológico de aves submetidas a diferentes sorovares de salmonelas paratíficas e também estudar a interação da *Salmonella* frente a probióticos. Para isso essa tese foi dividida em dois capítulos compostos por trabalhos científicos, sendo o capítulo I, intitulado “Resposta imunológica da mucosa intestinal de frangos de corte desafiados com diferentes sorovares de *Salmonella*”, onde os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* apresentaram um efeito mais intenso tanto no desempenho quanto na mobilização de células imunológicas para mucosa intestinal de frangos; Capítulo II um trabalho avaliando “Probióticos na ração para controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte” onde verificou-se que os probióticos testados tiveram diferentes efeitos sobre a redução de *Salmonella* Minnesota e também afetaram de forma diferente a dinâmica celular da mucosa cecal das aves. Estes estudos demonstraram que realmente ocorre uma interferência direta entre o comportamento de salmonelas paratíficas e outros microrganismos e, ainda, que diferentes sorovares de *Salmonella* podem apresentar diferentes interações com o sistema imunológico do hospedeiro.

**Palavras-Chave:** Custo imunológico, sorovares de *Salmonella*, probióticos, imunomodulação.

## ABSTRACT

Salmonellosis are among the most important diseases in commercial birds and its presence in poultry production is responsible for economic losses and public health related risks. *Salmonella* has been related to broilers since the early history of poultry production and its epidemiology and control are extremely complex, depending on many variables such as serotype, host, environment and also geographical features. There are several tools used to control *Salmonella* in broiler, but especially in recent years, there has been extensive search for a good modulation of intestinal microbiota, as a way to prevent its persistence in poultry flocks. Trying to better understand these aspects, this thesis has been developed with the aim of evaluating the clinical and immunological behavior of poultry under different serovars of paratyphoid salmonelas and, it also study the interaction of *Salmonella* with probiotics. This thesis was divided into two chapters composed of scientific work where Chapter I was entitled "Immune response of the intestinal mucosa in broilers challenged with different *Salmonella* serovars" where Enteritidis and Typhimurium showed the effect more intense both in performance and in the immune system of poultry, Chapter II is the evaluation of "Probiotics in feed for *Salmonella* Minnesota control in broiler", where the results indicated that the tested probiotics presented different effects on the reduction of S. Minnesota counts and affected the cell dynamics in the cecum mucosa of broilers differently. These studies demonstrated that there is a direct interference between the behavior of paratyphoid salmonelas and other microorganisms, and also that different *Salmonella* serovars may have different interactions with the host immune system.

**Keywords:** Immunological cost, *Salmonella* serovars, probiotics, immunomodulation.

## INTRODUÇÃO GERAL

Poucos são os microrganismos patogênicos transmitidos pelos alimentos que recebem tanta atenção por parte da comunidade científica como a *Salmonella* spp. Grande quantidade de experimentos (Berchieri Jr et al. 2001; Mead, 2004; Newell et al. 2010; Barrow et al. 2012) e até mesmo livros (Wray e Wray, 2000; Russel, 2012) têm sido publicados tratando exclusivamente do tema da Salmonelose. Isso significa amplo investimento em pesquisa buscando entender a relação desta bactéria com o homem, com os animais e com o ambiente. A investigação científica permitiu avanço significativo no entendimento dos mecanismos de infecção e resistência deste agente no hospedeiro. A disponibilidade de ferramentas como a imunoistoquímica, citometria de fluxo e determinação de citocinas, e técnicas moleculares de sequenciamento do genoma das aves, tem contribuído para a compreensão de como o hospedeiro responde à infecção.

Por outro lado, apesar da inegável evolução no conhecimento científico relativo a este patógeno, o seu controle ainda está baseado em abordagem empírica, como por exemplo, o uso eventual de antibioticoterapia em lotes positivos. Ainda existem várias questões a serem respondidas e a erradicação deste patógeno no moderno sistema de produção de aves ainda é uma meta utópica à luz do conhecimento até hoje adquirido (Barrow et al., 2012).

Ano após ano o Brasil tem se firmado como produtor de aves, sendo que ao redor de 32% de toda a produção nacional é exportada. Desde 2008 o Brasil conquistou o posto de maior exportador de carne de frango do mundo e tem sustentado esta posição (UBABEF, 2013). Os principais mercados externos para o produto avícola brasileiro são a Europa, Ásia e Oriente Médio.

Neste contexto, o controle da *Salmonella* spp dentro da cadeia produtiva ganha grande importância, pois a presença do patógeno na carne é parâmetro de qualidade e interfere na relação comercial entre os países, podendo levar até mesmo a destruição de produto exportado caso seja detectada a positividade (Back e Ishizuka, 2010).

A Europa lidera a lista de compradores mais exigentes com relação ao controle da carne de frango importada, sendo que os resultados da monitoria para *Salmonella* são publicados pela Autoridade Europeia em Segurança Alimentar (EFSA) através do sistema de alerta rápido em alimentos (RASFF, 2008). Todo o controle e monitoramento estão baseados em legislações específicas que determinam medidas de proteção contra zoonoses em produtos de origem animal de modo a prevenir toxinfecções alimentares transmitidas pelos alimentos (EU COUNCIL DIRECTIVE, 1992).

A identificação do gênero *Salmonella* ocorreu no final do século XIX. Seu nome refere-se ao cientista estadunidense Daniel Elmer Salmon que fez a relação entre a doença e o microrganismo. Este gênero é composto de bactérias Gram negativas, móveis ou imóveis, não formadores de esporos e anaeróbicos facultativos. O gênero *Salmonella* é composto de bactérias morfológica e bioquimicamente homogêneo (Gast, 2003), porém, dentro deste gênero, são conhecidos mais de 2500 sorotipos (Sharr, 2003), classificados em função da presença de antígenos somáticos (O) e flagelares (H).

Pela última taxonomia e nomenclatura proposta por Popoff et al. (1996), o gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie *Salmonella enterica* por sua vez é dividida em seis subespécies bioquimicamente distintas (*enterica*, *salmae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) que são ainda

diferenciadas em centenas de sorotipos (sorovar) identificados por nomes ou números. Assim, por este esquema, a designação de *Salmonella minnesota* passaria a ser *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serovar Minnesota, ou de forma simplificada *Salmonella* Minnesota (SM).

A maioria dos sorovares patogênicos encontram-se no gênero *Salmonella enterica* e normalmente recebem nomes relacionados com a espécie ou a região geográfica em que foram encontradas. A sorotipificação de toda *Salmonella* sp. da subespécie I ou *enterica* é importante para identificação das amostras mais patogênicas e para avaliações epidemiológicas (Rodrigues, 2011).

A *Salmonella* Enteritidis (SE) pertence ao grupo D, tendo antígenos somáticos O = 1, 9, 12 e antígenos flagelares H = g, m:1, 7. A *Salmonella* Typhimurium (ST) pertence ao grupo B, tendo antígenos somáticos O = 1, 4, 5, 12 e antígenos flagelares H = i: 1, 2. Já a *Salmonella* Minnesota (SM) pertence ao grupo L, tendo antígeno somático O 21 e antígenos flagelares H b: e, n, x (Popoff et al., 1996).

No ano de 2013 houve um aumento significativo das notificações por meio do RASFF ao produto de origem brasileira (UBABEF, 2013). Os sorovares mais prevalentes identificados na carne de frango brasileira foram a *Salmonella* Heidelberg seguida da *Salmonella* Minnesota. Isso deixa o setor em estado de alerta, pois além da exposição do produto brasileiro, os frigoríficos de origem também recebem auditorias do governo com relação aos procedimentos de controle em toda a cadeia produtiva, que podem levar até mesmo ao banimento da autorização para exportação (BRASIL, 2003).

A *Salmonella* é uma enterobactéria e como tal a sua relação com a resposta imunológica da mucosa intestinal e com a microbiota tem sido alvo de investigação (Calenge et al., 2010). Alguns sorovares têm presença mais restrita ao trato

gastrintestinal, enquanto outros são também microrganismos septicêmicos, sendo capazes de invadir a corrente circulatória (Berchieri Júnior e Barrow, 1995). A resposta imunológica da ave depende do grau de agressão e principalmente da capacidade de invasão do sorovar envolvido.

As infecções por salmonelas estimulam tanto imunidade celular quanto humoral. Infecções primárias provocam a produção do interferon gama (IFN $\gamma$ ) através das células T helper (CD4+) e células NK (Natural Killer). O IFN- $\gamma$  possui ação efetiva em cepas de salmonelas virulentas reativas a oxigênio, mas não é essencial para matar cepas avirulentas de vacinas (Van Immerseel et al., 2005). Entre as inúmeras funções do IFN- $\gamma$ , ressalta-se a ativação da habilidade dos macrófagos para matar as salmonelas.

Os antígenos replicantes vivos, de forma geral, determinam uma sinalização celular que culmina com a ligação do antígeno (mais especificamente de seu determinante antigênico) à outro complexo proteico chamado de MHC-I (Complexo de histocompatibilidade maior-I). A apresentação do determinante antigênico ligado à este MHC permite a interação da célula apresentadora com um linfócito T chamado de CD8+. Este CD8+ irá evoluir para um linfócito T citotóxico, o que, mediante reconhecimento do MHC-I ligado ao mesmo determinante antigênico em qualquer célula infectada, causará lise desta célula (Davison et al., 2008). Este mecanismo de defesa por ativação dos linfócitos T citotóxicos é particularmente importante no caso das infecções por *Salmonella*, pois se trata de uma bactéria intracelular facultativa (Berndt e Methner, 2001).

Por outro lado, a interação da *Salmonella* com o linfócito T CD4+, se dá por meio de outro complexo protéico chamado de MHC-II (Complexo de histocompatibilidade maior-II), levando a ativação do linfócito Th (linfócito T helper



ou auxiliar), que poderá gerar dois tipos de resposta, uma chamada Th1 e outra Th2. A resposta Th1 gerará linfócitos T que ativarão macrófagos infectados por bactérias intracelulares, enquanto a Th2 gerará linfócitos que irão interagir com linfócitos B sensibilizados pelo mesmo antígeno (Davison et al., 2008).

Comparações entre vacinas inativadas e vacinas vivas demonstraram que as últimas são mais efetivas no estímulo da resposta imune mediadas por células com participação de percentual de células CD4+ e CD8+ significativamente maior em relação a vacinas inativadas (Babu et al., 2003).

Grande parte do custo no sentido de controlar a *Salmonella* é realizado com foco nos animais seja por intervenções terapêuticas (medicações) ou por medidas de profilaxia e biossegurança (vacinação). O uso destas ferramentas é imprescindível para garantir a produtividade e saúde das aves (Mead, 2000; Van Immerseel et al., 2004; Van Immerseel et al., 2009). Porém cada vez mais a indústria avícola vem demonstrando interesse em desenvolver formas de reduzir também a contaminação ambiental deste patógeno, de modo a evitar a recontaminação dos animais (Mead, 2004).

No sistema moderno e intensivo de produção avícola brasileiro, múltiplos lotes são criados utilizando a mesma cama sequencialmente, nos quais, as aves recém eclodidas são alojadas nas granjas mantendo contato direto com a cama já no primeiro dia de vida. Assim, a microbiota ambiental irá se transferir para estes animais de forma bastante precoce visto elas não terem a sua microbiota estabelecida. Dessa forma, tratamento de cama por meio do enlonação, amontoamento ou mesmo a adição de cal no intervalo dos lotes são utilizados para controlar a qualidade microbiológica da cama, com o objetivo de reduzir a transmissão de doenças (Pope e Cherry, 2000; Roll et al., 2011).

Fries et al. (2005) demonstraram que a cama dos aviários é um complexo ecossistema onde encontramos grande quantidade de bactérias, vírus e protozoários. Normalmente a composição de microrganismos presentes na cama dos aviários acompanha a microbiota presente no intestino das aves sendo a maioria dos microrganismos apatogênicos.

Sendo assim, o objetivo geral desta tese foi o de investigar o tema das salmoneloses abordando os três principais fatores relacionados à patogenia desta doença: o agente etiológico por meio da comparação dos diferentes sorovares, o hospedeiro por meio do estudo da resposta imune do intestino das aves (capítulo I) e o ambiente pelo estudo da interação da *Salmonella* com microrganismos probióticos na dieta e de camas reutilizadas (capítulo II e anexo, respectivamente).

Esta tese foi elaborada em conformidade com as instruções da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e das Normas Internas para Elaboração de Dissertações e Teses da UFPR. Foi adotado o formato de capítulos, sendo os capítulos internos correspondentes a artigos cujo texto e elementos estão prontos para publicação em periódicos. A formatação da tese seguiu um mesmo padrão em todo o documento, com o mesmo tipo e formato de letra, parágrafos, tabulação, espaçamento de linhas, títulos de ilustrações e todos os outros elementos tipográficos, mantendo o formato geral padronizado da obra.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABU, U.; SCOTT, M.; MYERS, M.J.; OKAMURA, M.; GAINES, D.; YANCY, H.F.; LILLEHOJ, H.; HECKERT, R.; RAYBOURNE, R.B. Effects of live attenuated and killed *Salmonella* vaccine on T-lymphocyte mediated immunity in laying hens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.91, p. 39-44, 2003.

BACK, A.; ISHIZUKA, M. M. Principais Doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde. In: **Salmonelose aviária**. 1ed. Sao Paulo: Fundação Cargill, p.120-189, 2010.

BARROW, P.A.; JONES, M.A.; SMITH, A.L.; WIGLEY, P. The long view: *Salmonella* – the last forty years. **Avian Pathology**, v. 41, p. 413-420, 2012.

BERNDT, A.; METHNER, U. Gamma/Delta T cell response of chicken after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella* Typhimurium strains. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 78, p. 143-161, 2001.

BERCHIERI JR, A.; BARROW, P.A. Patologia e métodos de diagnóstico de *Salmonella enteritidis*. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 1995, Curitiba. **Anais da APINCO**. Curitiba: FACTA, p. 14-19, 1995.

BERCHIERI JR, A.; WIGLEY, P.; PAGE, K.; MURPHY, C.K.; BARROW, P.A. Further studies on vertical transmission and persistence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 in chickens. **Avian Pathology**, Cambs, v. 30, n.4, p. 297-310, 2001.

BRASIL. Instrução Normativa 78, de 3 de novembro de 2003. Dispõe sobre Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como Livres de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum* e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, Brasília, 2003.

CALENGE, F.; KAISER, P.; VIGNAL, A; BEAUMONT, C. Genetic control of resistance to salmonellosis and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. **Genetics Selection Evolution**, v. 42, p.1-11, 2010.

DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A. (2008). **Avian Immunology**. London: Academic Press.

EU Council Directive 92/117/EEC of 17 December 1992 concerning measures for protection against specified zoonoses and specified zoonotic agents in animals and products of animal origin in order to prevent outbreaks of food-borne infections and intoxications. **Official Journal of the European Union**, L 62, 15.3. 1993, 38-48, 1992.

FRIES, R; AKCAN, M; BANDICK, N; KOBE, A. Microflora of two different types of poultry litter. **British Poultry Science**, v. 46, p. 668-672, 2005.

GAST, R.K. *Salmonella* infections. In. CALNEK, B.W; BARNES, H.J.; BEARD, C.W. (Ed.) **Diseases of Poultry**. 11<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa University Press. cap. 16, p. 567-613, 2003.

MEAD, G.C. Prospects for competitive exclusion treatment to control *Salmonellas* and other foodborne pathogens in poultry. **Veterinary Journal**, v. 159, p. 111-123, 2000.

MEAD, G.C. Current trends in the microbiological safety of poultry meat. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v.60, n.1, p. 112-118, 2004.

NEWELL, D.G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F.; DER GIESSEN, J. V.; KRUSE, H. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, Supplement, n. 0, p. S3-S15, 5/30/2010.

POPE, M.J.; CHERRY, T.E. An evaluation of the presence of pathogens on broilers raised on poultry litter treatment-treated litter. **Poultry Science**, v.79, p. 1351-1355, 2000.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; HICKMAN-BRENNER, F.W. Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 147, n. 39, p. 765-769, 1996.

RASFF. The rapid alert system for food and feed. Annual report of European Comission, 56 p., 2008. Disponível em: [http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2008\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2008_en.pdf). Acessado em 16 de agosto de 2012.

RODRIGUES, D.P. Perspectivas atuais e falhas no diagnostico antigênico de *Salmonella* spp: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes, emergentes e exóticos. **Seminário Internacional de Salmoneloses Aviárias**. Rio de Janeiro, RJ. 2011.

ROLL, V.F.; DAI PRA M.A.; ROLL A.P. Research on *Salmonella* in broiler litter reused for up to 14 consecutive flocks. **Poultry Science**, v. 90, p. 2257-2262, 2011.

RUSSEL, S.M. (2012). **Controlling *Salmonella* in Poultry Production and Processing**. Boca Raton: CRC Press.

SHARR, H. Controles de *Salmonella* na União Européia. In. CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2003, Campinas. **Anais da APINCO**. Campinas: FACTA. p.357-368, 2003.

UBABEF, Relatório Anual 2012/2013. **União Brasileira de Avicultura**. SP. 2013. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>, acesso em 20/12/2013.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; BOYEN, F.; BOHEZ, L.; PASMANS, F.; VOLF, J.; SEVCIK, M.; RYCHLIK, I.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Medium-chain

fatty acids decrease colonization and invasion shortly after infection with *Salmonella* Enteritidis in chickens through *hilA* suppression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3582-3587, 2004.

VAN IMMERSEEL, F.; METHNER, U.; RYCHLIK, I.; NAGY, B.; VELGE, P.; MARTIN, G.; FOSTER, N.; DUCATELLE, R.; BARROW, P.A. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. **Epidemiology and infection**, Cambridge, p. 1-20, 2005.

VAN IMMERSEEL, F.; ZUTTER, L.; HOUF, K.; PASMANS, F.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Strategies to control *Salmonella* in broiler production chain. **World's Poultry Science Journal**, vol. 65, p. 367-391, 2009.

WRAY, C.; WRAY, A. (Eds.), (2000). **Salmonella in Domestic Animals**. Wallingford: CABI Publishing.

## **CAPÍTULO 1**

### **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DA MUCOSA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM DIFERENTES SOROVARES DE *SALMONELLA***

Este trabalho será submetido para publicação na Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

## **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DA MUCOSA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM DIFERENTES SOROVARES DE *Salmonella***

**RESUMO.** Foi delineado o presente estudo com o objetivo de comparar o efeito de diferentes sorovares de *Salmonella* na resposta imune local da mucosa do intestino de frangos de corte. Aos 7 dias de idade, frangos foram desafiados com os sorovares *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Senftenberg*, *S. Mbandaka* e *S. Minnesota*. Foi observado que todos os sorovares testados foram capazes de colonizar o intestino das aves sendo possível o isolamento de *Salmonella* em suabes de cloaca, 48 h após inoculação. De maneira geral, as aves do controle negativo, não desafiado, apresentaram quantidade significativamente menor de células imunológicas na mucosa intestinal do que as aves desafiadas. Porém, verificou-se que os sorovares de *Salmonella*, utilizados neste estudo, tiveram diferentes efeitos sobre a dinâmica celular da mucosa do íleo e ceco e afetaram de modo diferente o ganho de peso e ganho médio diário das aves demonstrando distintos graus de patogenicidade. Os sorovares *Enteritidis* e *Typhimurium* apresentaram um efeito mais intenso tanto no desempenho quanto na mobilização de células imunológicas para mucosa intestinal de frangos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Células caliciformes, macrófagos, células CD4+, células CD8+, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Mbandaka*, *Salmonella Senftenberg* e *Salmonella Minnesota*.

## EVALUATION OF IMMUNE RESPONSE OF THE INTESTINAL MUCOSA IN BROILERS CHALLENGED WITH DIFFERENT *SALMONELLA* SEROVARS

**ABSTRACT.** The present study was designed to compare the effect of different *Salmonella* serovar in immune response across the count of CD8+ cells, CD4+ cells, goblet cells and macrophages in the gut mucosa of broilers. During the experimental inoculation at 7 days of age were used serovars *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Senftenberg*, *S. Mbandaka* and *S. Minnesota*. It was observed that all serovars tested were capable of contaminating the poultry being possible counts of *Salmonella* in cloacal swabs, 48 h after inoculation and into the crop and cecum, at 14 and 20 days of age the poultry. Serovars tested had different effects on broiler performance assessed at 20 days. In the mucosa of the ileum and cecum of broilers, it was observed that some of the serotypes increased CD8 + cells, CD4 + cells, goblet cells and macrophages compared to the negative control group both at 14 days as at 20 days of life of the poultry; *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* are the serovars that showed the effect more intense both in performance and in the immune system of birds showing pathogenic characteristic; generally the broilers of the negative control showed significantly less immune cells on the intestinal mucosa than broilers inoculated experimentally. However, it was found that the *Salmonella* serovars used in this study had different effects on the cellular dynamics of the mucosa of the ileum and cecum and differently affect weight gain and average daily gain of poultry showing different levels of pathogenicity.

**KEY WORDS:** Goblet cells, macrophages, CD4+ cells, CD8+ cells, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Mbandaka, *Salmonella* Senftenberg and *Salmonella* Minnesota.



## INTRODUÇÃO

As salmoneloses estão entre as doenças potencialmente transmitidas pelos alimentos sendo utilizadas como critério de qualidade dos produtos e interferindo no comércio internacional da carne de frango. Bactérias deste gênero têm sido identificadas como uma das principais causas de toxinfecções alimentares em seres humanos (Mürmann et al., 2008). Esses microrganismos podem apresentar comportamento distinto dependendo do sorovar envolvido, sendo capazes de produzir desde infecções alimentares brandas até casos fatais.

No relatório anual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasileira (ANVISA 2007), a *Salmonella* Enteritidis (SE) representou o principal sorovar isolado em casos de toxinfecções em seres humanos com participação de 48,8% do total reportado. A SE também foi o principal sorovar detectado em amostras isoladas de frangos de corte no abatedouro, realizadas pelo Ministério da Agricultura do Brasil (Freitas, 2011). Neste levantamento também foi observado aumento no percentual de outros sorovares como, por exemplo, a *Salmonella* Minnesota encontrado em 9,38% das amostras entre o período de 2009 e 2010.

Distintos sorovares também tem sido reportados na Europa, em carne de frango exportada do Brasil (RASFF, 2012). Neste último ano os sorovares mais presentes tem sido a *Salmonella* Heidelberg seguida de *Salmonella* Minnesota.

O controle das salmoneloses, como zoonose, representa um desafio à saúde pública em função da complexidade da sua epidemiologia, onde a prevalência dos diferentes sorovares pode variar entre localidades, estados e países, sendo recomendado estabelecer medidas de vigilância e identificação destes sorovares em seres humanos e aves de produção, com o propósito de desenvolver programas de controle específicos (Souza, 2012).

Um fato relevante que dificulta o controle deste microrganismo na cadeia de produção de aves é a ausência de sinais clínicos e/ou lesões em lotes contaminados por sorovares paratífóides onde, na maioria das vezes, a ave é portadora assintomática (Feitas, 2011). Além disso, estudo epidemiológico realizado por Rabsch et al. (2000) demonstrou que existe relação de exclusão competitiva entre diferentes sorovares. Este comportamento de alternância entre sorovares distintos na população indica que o nicho ecológico de um sorovar específico pode ser ocupado por outro. Dessa forma, tendo em vista a emergência de novos sorovares e a re-emergência de outros em determinadas áreas, o controle das salmoneloses passa pelo conhecimento dos comportamentos dos diferentes sorovares em relação a sua prevalência e característica de patogenicidade. Pesquisas comparativas têm demonstrado que os diferentes sorovares apresentam distintas patogenicidades quando comparados entre si (Gast e Benson, 1995).

Com o objetivo de melhor entender como acontecem essas diferenças de resposta imunológica em frangos de corte, foi desenvolvido o presente estudo para comparar a infecção dos diferentes sorovares na resposta imune por meio da dinâmica de células imunológicas na mucosa intestinal de aves.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais e instalações**

Foram alojados 180 frangos de corte do 1° ao 20° dia de idade da linhagem COBB 500, divididos em seis tratamentos em delineamento experimental inteiramente casualizado (Tabela 1).

As aves de cada tratamento foram alojadas em salas isoladores, idênticas, com pressão negativa e localizadas lado a lado para evitar a contaminação entre os

diferentes tratamentos. Estas salas foram previamente limpas, desinfetadas e a cama de maravalha utilizada foi previamente esterilizada em autoclave 121° C/ 15 minutos. Foi realizado teste de esterilidade nas salas, equipamentos e cama por meio de suabes ambientais antes do início do experimento, assim como no fígado e ceco de cinco aves para certificar da ausência de *Salmonella*.

Os animais foram mantidos em temperatura ideal de conforto para a idade das aves de acordo com orientação do manual de manejo COBB, com fornecimento de água e ração à vontade, sendo alimentadas com dietas fareladas e balanceadas em níveis iguais aos recomendados para idade das aves (Rostagno, 2011). Para garantir a uniformidade, todas as aves foram pesadas individualmente e distribuídas igualmente de acordo com o peso inicial entre os tratamentos. Ao final do experimento (20° dia de idade), as aves foram novamente pesadas para cálculo do peso médio e ganho de peso diário nos diferentes tratamentos.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA SCA) da Universidade Federal do Paraná sob Protocolo n° 31-2011.

### **Digestibilidade**

Foi realizado experimento de digestibilidade para determinar o coeficiente de retenção de matéria seca (MS), de extrato etéreo (EE), de proteína bruta (PB) e de energia bruta (EB) nas fezes ileais das aves. Foi realizada coleta de excretas do íleo no momento da morte das 20 aves por tratamento (5 *pools* de 4 aves) aos 20 dias. Para determinação da digestibilidade foi utilizada a metodologia de Sakomura e Rostagno (2007). Em seguida, as amostras foram moídas e encaminhadas ao laboratório para análise de MS, EE, PB e EM segundo método descrito por Silva e

Queiroz (2002). Os resultados foram submetidos a análise de variância e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### Cepa e Desafio

Aos 7 dias de idade os animais dos tratamentos foram desafiados com 1 mL de suspensão de *Salmonella* Enteritidis (SE), *Salmonella* Typhimurium (ST), *Salmonella* Senftenberg (SS), *Salmonella* Mbandaka (SMb) e *Salmonella* Minnesota (SM) na concentração  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL por via oral de acordo com a Tabela 1. Estas cepas foram isoladas de lotes de frangos de corte em produtores em condições de criação industrial.

**Tabela 1 Descrição da fórmula antigênica dos diferentes sorovares de *Salmonella* utilizadas na inoculação experimental dos distintos tratamentos**

Tratamento Grupo	Sorovar	Antígeno Somático (O)	Antígeno Flagelar (H)		
			Fase 1	Fase 2	Outra
T1	Controle Negativo	-	-	-	
T2 – (D <sub>1</sub> )	S. Enteritidis	1,9,12	g,m	-	
T3 – (B)	S. Typhimurium	1,4,[5],12	i	1,2	
T4 – (E <sub>4</sub> )	S. Senftenberg	1,3,19	g,[s],t	-	[Z <sub>27</sub> ],[Z <sub>34</sub> ],[Z <sub>37</sub> ],[Z <sub>43</sub> ], [Z <sub>45</sub> ],[Z <sub>46</sub> ],[Z <sub>82</sub> ]
T5 – (C <sub>1</sub> )	S. Mbandaka	6,7,14	Z <sub>10</sub>	e,n,Z <sub>15</sub>	[Z <sub>37</sub> ],[Z <sub>45</sub> ]
T6 – (L)	S. Minnesota	21	b	e,n,x	[Z <sub>33</sub> ],[Z <sub>49</sub> ]

Para o preparo do inóculo, uma colônia pura de cada sorovar, isolada de frangos de corte, foi retirada do Agar estoque e incubada em solução de BHI (Brain Heart Infusion) por 24h a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ . Esta suspensão foi diluída até a concentração 0,5 da Escala de MacFarland e aferida em espectrofotômetro, previamente descrito por Pickler et al. (2012), sendo posteriormente cultivada em meio de cultura para determinar a contagem de unidades formadoras de colônias por mL.

### **Coleta de material para microbiologia, histopatologia e imunoistoquímica**

Para análise microbiológica foram realizados suabes de cloaca 48 h após inoculação, sendo 5 amostras por tratamento (cada amostra foi composta por um *pool* de 3 animais) para análise de contagem de *Salmonella*. Aos 14 e aos 20 dias de idade (10 animais por tratamento/coleta) foram necropsiados para coleta de papo e ceco de forma asséptica e posterior análise de *Salmonella*.

Foram realizadas também coletas de fragmentos de íleo e ceco de 5 animais por tratamento fixados em formol tamponado 10% para análise de células caliciformes e fragmentos dos mesmos segmentos congelados em nitrogênio líquido para posterior análise de linfócitos T CD8+, CD4+, células caliciformes e macrófagos.

### **Processamento das amostras para análise microbiológica**

As análises de contagem de *Salmonella* foram realizadas de acordo com Pickler et al. (2012). Os suabes de cloaca, os papos e os cecos foram diluídos em água peptonada 2% em proporção de 1:10. Retirou-se 1 mL da solução de água peptonada 2% que foi pipetado no tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1% e assim sucessivamente até a diluição  $10^{-3}$ . Posteriormente retirou-se 100  $\mu$ L de cada diluição, plaqueou-se em duplicata em meio Verde Brilhante com novobiocina e com alça de Drigalsky esterilizada espalhou-se o líquido na placa. As placas foram incubadas em estufa regulada a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 h e submetidas à posterior contagem das colônias típicas.

A solução inicial de água peptonada 2% foi incubada a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 h, em caso de não ter ocorrido crescimento de colônias típicas de *Salmonella* sp. em

plaqueamento direto, retirou-se 100 µL da solução inicial em água peptonada 2% e acrescentou-se em um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, incubou-se em estufa regulada a  $42\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 h para confirmação da positividade ou negatividade da amostra.

Os resultados das contagens de colônias foram expressos de acordo com Procedimentos de Contagem de Colônia de acordo com a Normativa nº 62 publicada em 26 de agosto de 2003 (Brasil - MAPA). Os resultados foram transformados em Log10 para análise estatística. Amostras de colônias foram enviadas ao FIOCRUZ para tipificação.

### **Processamento e leitura do material para histopatologia e imunoistoquímica**

Para as análises de linfócitos T CD8+, CD4+ e macrófagos, as amostras foram incluídas em gel Tissue-Tek O. C. T. (Miles, Elkhart IN, US), congeladas em nitrogênio líquido, seccionadas com 5 µm de espessura em aparelho criostato e fixadas em lâminas carregadas positivamente em acetona 100%. Em seguida foi realizada a re-hidratação com PBS 0,1M pH 7,6, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos e proteína bloqueadora por 8 minutos. Os anticorpos primários utilizados foram Anti-CD8 (CT-8 Southern Biotech 1:100), Anti-CD4 (CT-4 Southern Biotech 1:100) e Anti-macrófago KUL01 Southern Biotech 1:150), incubados por 90 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Para detecção da reação foram utilizados anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho combinados em sistema de amplificação, kit ADVANCE®, por 30 minutos. Para revelação da reação foi utilizado cromógeno, kit DAB®, por 30 segundos. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Meyer, lavadas em água para posterior montagem das mesmas, adaptado de Jeurissen et al. (2002).

Campos microscópicos com presença de células positivas foram quantificados em microscopia de luz com ampliação de 100X (Olympus BX41 Olympus America INC., NY, USA). Foram analisados 20 campos para cada tratamento e para cada marcador de superfície celular.

As amostras de íleo e ceco foram processadas rotineiramente para histologia e coradas com Alcian Blue. Foi avaliado o número de células caliciformes, com leitura de 20 campos por tratamento em aumento de 100X (Olympus BX41 Olympus America INC., NY, USA) (Smirnov et al. 2004).

### **Análise Estatística**

Para realização da análise estatística foi utilizado o programa estatístico StatView for Windows Copyright® 1998 (SAS Institute Inc., NC, USA). As contagens de colônias de *Salmonella* foram transformadas em Log 10 para análise estatística. As variáveis foram analisadas inicialmente pelo teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Todos os resultados foram submetidos à ANOVA, sendo aplicado o teste de Tukey à 5% de probabilidade para as variáveis paramétricas (peso médio e digestibilidade) e o teste de Kruskal-Wallis à 5% para as variáveis não paramétricas (microbiologia e imunoistoquímica).

## **RESULTADOS**

### **Desempenho e digestibilidade**

O peso médio e ganho de peso diário das aves nos diferentes tratamentos ao primeiro e ao 20º dia de idade estão expressos na Tabela 2. Foi possível observar que aves desafiadas com SM apresentaram maior ganho de peso diário e peso vivo aos 20 dias quando comparadas a aves desafiadas com ST e SE.

**Tabela 2. Peso médio e ganho de peso diário das aves (GPD) erro padrão nos diferentes tratamentos ao primeiro, e 20 dias de idade (Resultados Expressos em gramas)**

TRATAMENTO	Peso 1 dia	Peso 20 dias	GPD 1-20 dias
Controle negativo	43,80 ±2,20	863,30 ±58,60 <sup>ab</sup>	40,92 ±2,89 <sup>ab</sup>
<i>Salmonella</i> Enteritidis	43,52 ±2,53	858,16 ±129,20 <sup>b</sup>	40,74 ±6,47 <sup>b</sup>
<i>Salmonella</i> Typhimurium	43,72 ±2,46	849,93 ±62,43 <sup>b</sup>	40,29 ±3,12 <sup>b</sup>
<i>Salmonella</i> Senftenberg	43,32 ±2,63	888,27 ±71,24 <sup>ab</sup>	42,24 ±3,52 <sup>ab</sup>
<i>Salmonella</i> Mbandaka	43,55 ±2,51	886,00 ±94,15 <sup>ab</sup>	42,13 ±4,66 <sup>ab</sup>
<i>Salmonella</i> Minnesota	43,55 ±2,25	923,13 ± 68,00 <sup>a</sup>	43,97 ±3,40 <sup>a</sup>
<b>Valor de P</b>	<b>0,9700</b>	<b>0,0100</b>	<b>0,0000</b>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste estatístico de Tukey  $P \leq 0,05$

Os resultados do percentual de digestibilidade de MS, EE, PB e EB das fezes ileais coletadas com 20 dias de idade das aves estão expressos na Tabela 3. Não houve diferença significativa entre os percentuais de digestibilidade de MS, EE e EB nos diferentes tratamentos. Já na digestibilidade da PB houve diferença significativa apenas entre o grupo inoculado com SMb e o grupo controle e a SS. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

**Tabela 3. Taxa de retenção de nutrientes nos diferentes tratamentos. (Resultados expressos em % de digestibilidade)**

Tratamento	MS	EE	PB	EB
Controle negativo	69,38	92,80	84,44 <sup>a</sup>	70,49
<i>Salmonella</i> Enteritidis	69,30	92,74	82,47 <sup>ab</sup>	70,70
<i>Salmonella</i> Typhimurium	68,61	91,73	82,51 <sup>ab</sup>	69,74
<i>Salmonella</i> Senftenberg	70,54	91,97	84,26 <sup>a</sup>	71,48
<i>Salmonella</i> Mbandaka	67,95	90,71	81,41 <sup>b</sup>	69,49
<i>Salmonella</i> Minnesota	69,07	92,35	83,60 <sup>ab</sup>	69,99
<b>Valor de P</b>	<b>0,4077</b>	<b>0,0555</b>	<b>0,0119</b>	<b>0,5377</b>
<b>CV</b>	<b>2,71</b>	<b>1,19</b>	<b>1,65</b>	<b>2,53</b>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey  $P \leq 0,05$   
 \* MS – Matéria Seca, EE – Extrato Etéreo, PB – Proteína Bruta, EB – Energia Bruta.

## Microbiologia

As amostras de fígado e ceco coletadas no primeiro dia foram todas negativas para análise de *Salmonella* sp. O tratamento negativo não inoculado permaneceu negativo para *Salmonella* durante todo o período indicando a eficiência do sistema de isolamento entre as câmaras que separavam os tratamentos.



Os resultados da contagem de colônias de *Salmonella* (média  $\pm$  erro padrão) em suabe de cloaca 48 h após inoculação, papo e ceco aos 14 e 20 dias de idade dos diferentes tratamentos estão expressos nas Tabelas 4 e 5. Todos os sorovares testados foram capazes de contaminar significativamente as aves sendo possível a contagem dos respectivos sorovares em suabes 48 h pós-inoculação e também nos papos e cecos aos 14 e 20 dias das aves. As amostras positivas submetidas ao teste de sorotipificação demonstraram que não houve contaminação cruzada entre os diferentes sorovares utilizados no experimento.

**Tabela 4. Média e erro padrão da contagem de *Salmonella* em suabes de cloaca realizados nos diferentes tratamentos 48 h após a inoculação (Resultados expressos em Log10)**

Tratamento	Média $\pm$ EP
Controle negativo	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
<i>Salmonella</i> Enteritidis	2,05 $\pm$ 0,85 <sup>b</sup>
<i>Salmonella</i> Typhimurium	3,32 $\pm$ 0,53 <sup>c</sup>
<i>Salmonella</i> Senftenberg	2,13 $\pm$ 1,00 <sup>b</sup>
<i>Salmonella</i> Mbandaka	2,15 $\pm$ 0,80 <sup>b</sup>
<i>Salmonella</i> Minnesota	2,22 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>
<b>Valor de P</b>	<b>0,001</b>

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal Wallis P  $\leq$  0,05

**Tabela 5. Média e erro padrão da contagem de *Salmonella* nos diferentes tratamentos em papo e ceco aos 14 dias e 20 dias de idade das aves (Resultados expressos em Log 10)**

Fragmento/ Idade	n	Controle	SE*	ST*	SS*	SMB*	SM*
Papo/14 dias	10	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	1,33 $\pm$ 0,95 <sup>b</sup>	1,62 $\pm$ 0,72 <sup>b</sup>	2,23 $\pm$ 1,44 <sup>b</sup>	1,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	1,70 $\pm$ 1,41 <sup>b</sup>
Ceco/14 dias	10	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	3,90 $\pm$ 1,36 <sup>c</sup>	3,64 $\pm$ 1,35 <sup>bc</sup>	3,01 $\pm$ 2,18 <sup>bc</sup>	2,00 $\pm$ 1,75 <sup>b</sup>	4,35 $\pm$ 1,53 <sup>c</sup>
Papo/20 dias	10	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,87 $\pm$ 0,35 <sup>ab</sup>	1,50 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>	1,30 $\pm$ 0,50 <sup>b</sup>	1,12 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	0,55 $\pm$ 1,54 <sup>ab</sup>
Ceco/20 dias	10	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	3,92 $\pm$ 1,12 <sup>c</sup>	2,15 $\pm$ 1,34 <sup>b</sup>	3,36 $\pm$ 2,00 <sup>c</sup>	2,92 $\pm$ 1,90 <sup>bc</sup>	2,97 $\pm$ 1,83 <sup>bc</sup>
<b>Valor de P</b>		<b>&lt;0,001</b>					

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal Wallis P  $\leq$  0,05

\* SE - *Salmonella* Enteritidis, ST - *Salmonella* Typhimurium, SS - *Salmonella* Senftenberg, SMB - *Salmonella* Mbandaka e SM - *Salmonella* Minnesota.

## Histopatologia e Imunoistoquímica

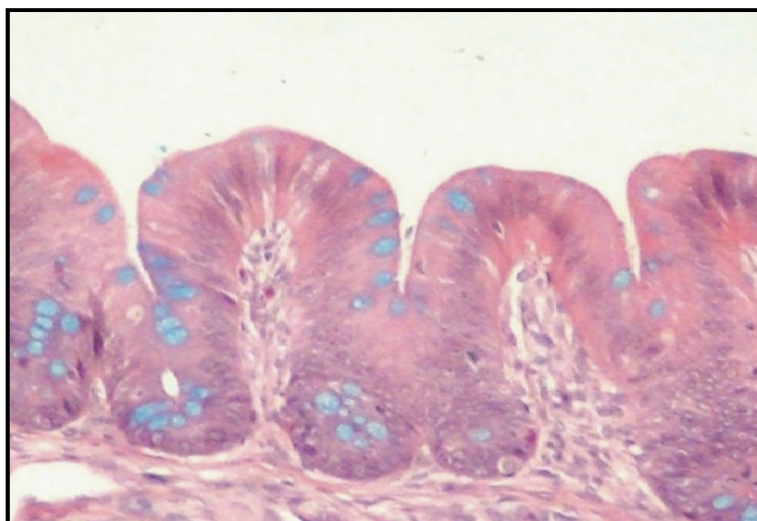
A Tabela 6 expressa os resultados da contagem de linfócitos CD8+, CD4+, células caliciformes e macrófagos aos 14 e 20 dias de idade no íleo e ceco de frangos de corte nos diferentes tratamentos. As Figuras 1 e 2 demonstram cortes histológicos do ceco das aves com aplicação da técnica de imunoistoquímica para células caliciformes e células CD8+ respectivamente.

**Tabela 6. Média da contagem de células CD8+, CD4+, caliciformes e macrófagos no intestino das aves dos diferentes tratamentos aos 14 e 20 dias de idade (Resultados em unidades)**

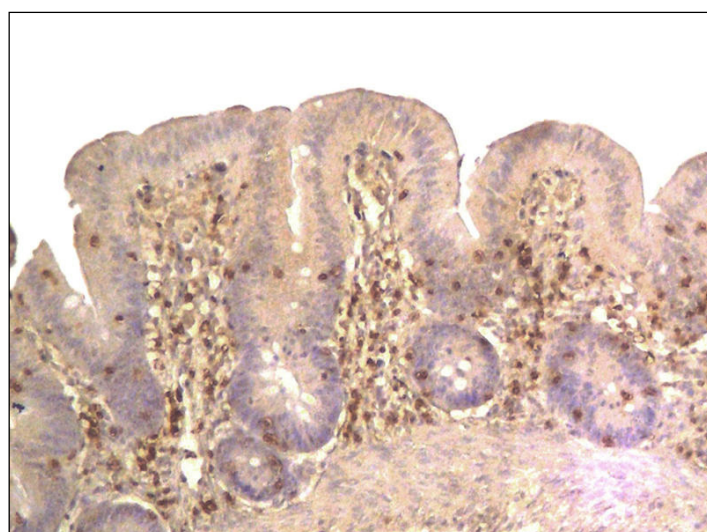
Fragmento/Idade	Variável	n	Controle	SE*	ST*	SS*	SMb*	SM*
Íleo/14 dias	CD8+	10	27,90 <sup>b</sup>	62,70 <sup>a</sup>	63,13 <sup>a</sup>	47,6 <sup>ab</sup>	34,63 <sup>b</sup>	37,03 <sup>ab</sup>
	CD4+	10	9,76 <sup>c</sup>	69,80 <sup>a</sup>	67,46 <sup>a</sup>	47,2 <sup>ab</sup>	32,03 <sup>bc</sup>	46,66 <sup>ab</sup>
	Caliciformes	20	34,82 <sup>c</sup>	79,62 <sup>ab</sup>	99,10 <sup>a</sup>	32,7 <sup>c</sup>	68,92 <sup>ab</sup>	47,85 <sup>bc</sup>
	Macrófago	10	12,26 <sup>b</sup>	54,86 <sup>a</sup>	62,7 <sup>a</sup>	53,9 <sup>a</sup>	53,63 <sup>a</sup>	35,53 <sup>ab</sup>
Íleo/20 dias	CD8+	10	16,60	31,25	27,80	35,55	33,05	38,75
	CD4+	10	10,75 <sup>c</sup>	39,10 <sup>ab</sup>	53,35 <sup>a</sup>	30,1 <sup>bc</sup>	26,55 <sup>bc</sup>	23,15 <sup>bc</sup>
	Caliciforme	20	68,55	78,52	64,90	49,7	53,87	47,42
	Macrófago	10	6,70 <sup>c</sup>	40,75 <sup>bc</sup>	46,60 <sup>a</sup>	29,5 <sup>abc</sup>	36,80 <sup>ab</sup>	22,60 <sup>bc</sup>
Ceco/14 dias	CD8+	10	22,23 <sup>b</sup>	62,46 <sup>a</sup>	75,50 <sup>a</sup>	32,3 <sup>b</sup>	48,86 <sup>b</sup>	31,36 <sup>b</sup>
	CD4+	10	28,50 <sup>bc</sup>	66,10 <sup>a</sup>	59,83 <sup>a</sup>	44,1 <sup>abc</sup>	52,90 <sup>a</sup>	21,53 <sup>c</sup>
	Caliciforme	20	50,00 <sup>bc</sup>	93,05 <sup>a</sup>	72,32 <sup>ab</sup>	58,3 <sup>bc</sup>	52,22 <sup>bc</sup>	37,02 <sup>c</sup>
	Macrófago	10	27,83 <sup>bc</sup>	52,68 <sup>ab</sup>	71,53 <sup>a</sup>	53,1 <sup>ab</sup>	51,86 <sup>ab</sup>	15,96 <sup>c</sup>
Ceco/20 dias	CD8+	10	29,30 <sup>ab</sup>	23,05 <sup>b</sup>	47,00 <sup>a</sup>	47,2 <sup>a</sup>	19,55 <sup>b</sup>	16,90 <sup>b</sup>
	CD4+	10	7,15 <sup>c</sup>	45,20 <sup>a</sup>	47,45 <sup>a</sup>	30,8 <sup>ab</sup>	20,20 <sup>bc</sup>	32,20 <sup>ab</sup>
	Caliciforme	20	51,27 <sup>bc</sup>	91,87 <sup>a</sup>	72,20 <sup>ab</sup>	49,9 <sup>bc</sup>	62,10 <sup>abc</sup>	35,62 <sup>c</sup>
	Macrófago	10	21,70 <sup>bc</sup>	45,10 <sup>a</sup>	22,80 <sup>abc</sup>	45,6 <sup>a</sup>	35,75 <sup>ab</sup>	12,00 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal Wallis  $P \leq 0,05$

\* SE - *Salmonella* Enteritidis, ST - *Salmonella* Typhimurium, SS - *Salmonella* Senftenberg, SMb - *Salmonella* Mbandaka e SM - *Salmonella* Minnesota.



**Figura 1: Fotomicrografia dos cecos das aves com 20 dias de vida demonstrando as células caliciformes coradas presentes na mucosa intestinal. (Imunoistoquímica, 40X).**



**Figura 2: Fotomicrografia dos cecos de aves com 20 dias de vida demonstrando as células CD8+ coradas presentes no intestino. (Imunoistoquímica, 40X).**

Na análise de células CD8+ no íleo aos 14 dias de idade, aves desafiadas com SE e ST apresentaram quantidade significativamente maior de células quando comparado as aves desafiadas com SMb ou não desafiadas. Aos 20 dias de idade, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, no íleo. No ceco aos 14 dias de idade, foi observada quantidade

significativamente maior de células CD8+ nos grupos desafiados com SE e ST quando comparado aos demais tratamentos. E aos 20 dias de idade no ceco, os grupos desafiados com ST e SS apresentaram contagem significativamente maior de células CD8+ com relação aos demais grupos exceto o controle.

No íleo, aos 14 e aos 20 dias de idade, as aves desafiadas com SE e ST apresentaram contagem significativamente maior de células CD4+ que o grupo controle. No ceco, aos 14 dias os grupos desafiados com SE, ST e SMb apresentaram quantidade significativamente maior de células CD4+ quando comparado ao controle negativo e ao grupo desafiado com SM. Aos 20 dias, no ceco, as aves desafiadas com SE, ST, SS e SM apresentaram quantidade significativamente maior de células CD4+ que o grupo controle.

Com relação a contagem de células caliciformes, aos 14 dias de idade no íleo, os grupos não desafiado e desafiado com SS apresentaram contagem significativamente menor que os grupos com SE, ST e SMb. Aos 20 dias no íleo não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. No ceco aos 14 e aos 20 dias de idade os grupos desafiados com SE e ST apresentaram contagem de células caliciformes significativamente maior quando comparada ao grupo desafiado com SM.

Na análise de macrófagos na mucosa intestinal, aos 14 dias de idade no íleo, o grupo controle negativo apresentou quantidade significativamente menor de células que os demais grupos desafiados exceto o grupo SM. Aos 20 dias no íleo, o controle negativo apresentou quantidade significativamente menor de macrófagos que os grupos desafiados com ST e SMb. Aos 14 e 20 dias no ceco, aves do grupo desafiado com SM, apresentaram quantidade significativamente menor do que os grupos desafiados com SE, SS e SMb.

## DISCUSSÃO

De maneira geral, a contaminação pelas salmonelas paratíficas não interferem de forma significativa no desempenho zootécnico das aves, pois este grupo de salmonelas estão altamente adaptadas as aves e convivem de forma equilibrada com o hospedeiro. Porém, alguns sorovares, como por exemplo, a SE, tem extensa colonização no trato digestório e causam doença com envolvimento do sistema imunológico (Gast e Benson, 1995).

A avaliação de retenção e metabolizabilidade tem sido utilizada em experimentos de nutrição para avaliar a digestibilidade do alimento (Ravindran et al., 1999). No presente trabalho investigou-se as diferenças na digestibilidade e desempenho das aves desafiadas com os diferentes sorovares. Com relação ao peso aos 20 dias nos diferentes tratamentos, o que mais se destaca foi o menor peso de aves inoculadas com SE e ST quando comparadas as aves desafiadas com SM, o que pode ser relacionado com o custo da resposta imunológica destas aves desafiadas com sorotipos de *Salmonella* muito imunogênicos como SE e ST (Berndt e Methner, 2001).

Nestes casos a resposta do organismo é a produção aumentada de células e proteínas como as proteínas de fase aguda sintetizadas pelo fígado (Klasing, 2007) e consequente piora no desempenho zootécnico. Este aumento na produção de células como resposta imunológica resulta em redistribuição e maior gasto de nutrientes como lisina. Estima-se que nas aves submetidas a desafio, a resposta imunológica inata e adaptativa utilizem 550  $\mu\text{mol/kg/dia}$  de lisina, a qual poderia ser utilizada para o crescimento animal sendo convertida em 7,8 g de massa corporal/kg de peso vivo (Klasing, 2004).

De acordo com Ravindran et al. (1999), houve consenso que o método de coleta de conteúdo ileal ao invés da coleta total de excretas é o método mais eficiente para avaliação da digestibilidade dos alimentos em aves. Isso se deve ao fato de que a coleta neste ponto do intestino neutraliza o efeito adverso da microbiota cecal na digestibilidade da proteína. Utilizando esta metodologia, no presente estudo, verificou-se maior digestibilidade da proteína no grupo controle comparado ao grupo desafiado com SMb. Como este achado não está relacionado a piora no ganho de peso deste grupo desafiado com SMb, poderia ser relacionado a maior perda de integridade intestinal neste grupo, entretanto seria necessário mais estudos para entender estes resultados.

A *Salmonella* é considerada um patógeno intracelular facultativo e a imunidade mediada por células tem um papel muito importante para a eliminação do patógeno dos tecidos, com a participação de células T (Holt et al., 2010). Trabalhos prévios avaliaram a interação dessas células em agregados linfóides intestinais após infecção oral com *Salmonella* em aves jovens (Sasai et al., 2000; Berndt et al., 2007; Hemert et al., 2007). As células T CD8<sup>+</sup> desempenham um importante papel no combate das infecções primárias por salmonelas, assim como a resposta por IgA e leucócitos polimorfonucleados (Bernidt e Methener, 2001).

No presente estudo foi observado que aves desafiadas com SE e ST apresentaram maior contagem de células CD4<sup>+</sup> no íleo e ceco das aves aos 14 e 20 dias, quando comparado aos demais sorovares e o controle negativo, o que também foi observado em trabalhos prévios onde foi evidenciado maior expressão destas células após infecção oral com SE (Sasai et al., 2000; Asheg et al., 2002) e com ST (Berndt e Methner, 2001; Beal et al., 2004). Em contrapartida, Hemert et al. (2007) mostraram diminuição na contagem destas células no jejuno ao primeiro e ao quinto

dia pós-inoculação oral de 0,2 ml de  $10^5$  UFC/ml de *Salmonella* Enteritidis quando comparado com o controle negativo.

O número de células CD8<sup>+</sup> também foi maior no íleo e ceco de aves desafiadas com SE e ST quando comparado com os demais tratamentos. Berndt e Methner (2001) observaram em frangos inoculados com ST aumento destas células no ceco nos primeiros 9 dias PI comparado com o controle. Observa-se que aves desafiadas com SE apresentam aumento na quantidade de linfócitos T CD3<sup>+</sup> (Pickler et al., 2013) e CD8<sup>+</sup> (Berndt et al., 2006) na mucosa intestinal e redução dessas células na circulação sanguínea concluindo que rapidamente essas células migram do sangue ao intestino, primeiro sítio de infecção da *Salmonella*.

A maior expressão celular na mucosa intestinal dos frangos desafiados é devido à alta patogenicidade e capacidade imunogênica que possuem SE e ST (Hassan et al., 1991; Desmidt et al., 1997). Durante a infecção intestinal estes dois sorovares penetram nos enterócitos resultando em uma resposta inflamatória considerável, ao contrário da *Salmonella* Pullorum e Gallinarum que geram uma resposta inflamatória muito menor no intestino e maior em outros tecidos que colonizam (Barrow et al., 2012). Os sorovares hospedeiro-específicos persistem mais nos linfonodos mesentéricos, no caso de mamíferos, e são determinantes para sua virulência sistêmica (Paulin et al., 2002).

Em suínos inoculados oralmente com cepas de *Salmonella* Typhimurium e de *Salmonella* Choleraesuis, observou-se elevada contagem do sorovar Choleraesuis em linfonodos mesentéricos, enquanto o sorovar Typhimurium é associado com a rápida multiplicação na mucosa intestinal. Outra observação foi de que animais inoculados com ST apresentaram maior excreção que os desafiados com Choleraesuis. As diferenças também podem ser constatadas na resposta de

citocinas, às 24 h PI, a ST provocou altos níveis de transcrição de TNF, IL-8 e IL-18 comparado com o sorovar Choleraesuis, de tal maneira que estes elevados níveis de citocinas pro-inflamatórias podem afetar a microbiota do intestino e promover a persistência intestinal da bactéria patogênica (Paulin et al., 2007).

A rápida multiplicação da ST poderia desencadear a primeira resposta inflamatória seguida de uma infecção de grande magnitude, isso confinaria localmente o processo à mucosa intestinal, enquanto que a lenta multiplicação do sorovar Choleraesuis lhe permitiria evadir da ativação da resposta imune inata, favorecendo sua disseminação (Uthe et al., 2007).

Os macrófagos tem uma importante função na defesa contra *Salmonella*. *In vitro*, essas células são capazes de fagocitar a *Salmonella* e prevenir sua multiplicação por meio de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Shiloh e Nathan, 2000). Em trabalho realizado em cultivo celular Qureshi et al. (2000) observaram que macrófagos de aves foram capazes de eliminar efetivamente ST. No presente estudo, realizado *in vivo*, observou-se aumento significativo destas células nos tratamentos inoculados com SE e ST, sendo que nossos dados concordam com o trabalho de Berndt e Methner (2004), que observou grande quantidade de macrófagos no ceco de aves infectadas com ST entre os dias 4 e 12, com um pico de expressão celular ao quinto dia PI e com trabalhos de Van Immerseel et al. (2002) que observaram invasão de macrófagos na lâmina própria do ceco após inoculação com SE.

No presente estudo, aves inoculadas com SM apresentaram o maior peso quando comparada aos demais tratamentos. Estes resultados chamam a atenção, pois, além de inéditos, são contrários ao consenso geral de que toda *Salmonella* traz algum prejuízo ao desempenho dos animais contaminados independentemente do



sorovar. Em adição, os resultados de células CD4+, CD8+ e macrófagos no intestino parecem mostrar que este sorotipo é pouco imunogênico, podendo se adaptar muito bem à microbiota intestinal, promovendo pouca resposta imunológica local, fato este que merece mais estudos para melhor compreensão da resposta imunológica de aves à SM e entendimento da eventual condição de equilíbrio que este microrganismo estabelece com o hospedeiro.

A composição antigênica utilizada para caracterizar os sorovares (Tabela 1) demonstra que a SM difere significativamente dos demais sorovares, pois não compartilha nenhum antígeno tanto somático quanto flagelar com os demais sorovares deste estudo. Isso é um indicativo da razão pela qual este sorovar pouco induz resposta na mucosa do intestino das aves.

Já os sorovares SS e SMb apresentaram comportamento intermediário em relação a SE, ST e SM, tanto na capacidade de estimular o sistema imunológico quanto na interferência em peso aos 20 dias. Eles assumiram posição média na imunogenicidade e no efeito em desempenho das aves inoculadas. Estes dados estão de acordo com o trabalho comparativo de Gantois et al. (2008) que indicaram maior capacidade de colonização dos órgãos reprodutores da SE e ST em relação a outros sorovares estudados. Aparentemente alguns sorovares possuem características particulares que aumentam a chance de contaminar as aves causando perdas zootécnicas levando a um maior estímulo do sistema imune da ave.

Conclui-se que existe uma relação entre a intensidade de estímulo do sistema imunológico e o gasto energético dos animais, sendo que microrganismos mais patogênicos repercutem em menor ganho de peso das aves em função do custo para a formação da defesa linfocitária de mucosa. Além disso, os sorovares de

*Salmonella* estudados demonstraram diferentes efeitos sobre a dinâmica celular da mucosa do íleo e ceco e afetaram de modo diferente o ganho de peso e ganho médio diário das aves. Mais estudos avaliando resposta imunológicas precoces com avaliação de citocinas precisam ser conduzidos para se compreender melhor esses resultados.

## REFERÊNCIAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2007). **Relatório anual 2007**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/Relatorio\\_GGALI\\_2007.pdf](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/Relatorio_GGALI_2007.pdf) Acesso em 16 de agosto de 2012.

ASHEG, A.; LEVKUT, M.; REVAJOVÁ, V.; ŠEVČÍKOVÁ, Z.; KOLODZIEYSKI, L.; PISTL, J. T lymphocyte subpopulations and B lymphocyte cells in caecum and spleen of chicks infected with *Salmonella* Enteritidis. **Acta Histochemica**, v. 104, p. 435-439, 2002.

BARROW, P.A.; JONES, M.A.; SMITH, A.L.; WIGLEY, P. The long view: *Salmonella* – the last forty years. **Avian Pathology**, v. 41, p. 413-420, 2012.

BEAL, R.K.; POWERS, C.; WIGLEY, P.; BARROW, P.A.; SMITH, A.L. Temporal dynamics of the cellular, humoral and cytokine responses in chickens during primary and secondary infection with *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. **Avian Pathology**, v. 33, p. 25-33, 2004.

BERNDT, A.; METHNER U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella* Typhimurium strains. *Vet. Immunol.* **Immunopathology**, v. 78, p. 143-161, 2001.

BERNDT A.; METHNER U. B cell and macrophage response in chicks after oral administration of *Salmonella* Typhimurium strains. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases**, v. 27, p. 235-246, 2004.

BERNDT A.; PIEPER, J.; METHNER, U. Circulating  $\gamma\delta$  T cells in response to *Salmonella* enterica serovar Enteritidis exposure in chickens. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 3967-3978, 2006.

BERNDT A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U. Chicken cecum immune response to *Salmonella* enterica serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 5993-6007, 2007.

BRASIL - MAPA, Instrução Normativa nº62 publicada em 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle

de Produtos de Origem Animal e Água. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, Brasília, 2003.

DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage type four after experimental infection of young chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 56, p. 99-109, 1997.

FREITAS, J. Evolução de sorovares Modelo de Banco de Cepas. Seminário Internacional de Salmonellose Aviária. Rio de Janeiro, 2011.

GANTOIS, I.; EECKHAUT, V.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. **Avian Pathology**, v. 37, n. 4, p. 399-406, 2008.

GAST, R.K.; BENSON, S.T. The comparative virulence for chicks of *Salmonella* enteritidis phage type 4 isolates and isolates of phage types commonly found in poultry in the United States. **Avian Diseases**, v. 39, p. 567-574, 1995.

HASSAN, J.O.; MOCKETT, A.P.A.; CATTY, D.; BARROW, P.A. Infection and reinfection of chickens with *Salmonella* Typhimurium: Bacteriology and immune responses. **Avian Diseases**, v. 35, p. 809-819, 1991.

HEMERT, S.V.; HOEKMAN, A.J.W.; SMITS, M.A.; REBEL, J.M.J. Immunological and gene expression responses to a *Salmonella* infection in the chicken intestine. **Veterinary Research**, v. 38, p. 51-63, 2007.

HOLT, P.S.; VAUGHN, L.E.; GAST, R.K. Flow cytometric characterization of Peyer's patch and cecal tonsil T lymphocytes in laying hens following challenge with *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 133, p. 276-281, 2010.

JEURISSEN, S.; LEWIS, F.; VAN DER KLIS, J.D.; MROZ, Z.; REBEL, J.; HUURNE, A. Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity, and functionality. **Current Issues Intestinal Microbiology**, v. 3, p. 14-30, 2002.

KLASING, K.C. The costs of immunity. **Acta Zoologica Sinica**, v. 50, p. 961-969, 2004.

KLASING, K.C. Nutrition and the immune system. **British Poultry Science**, v. 48, p. 525-537, 2007.

MÜRMANN, L.; SANTOS, M.C.D; LONGARAY, S.M.; BOTH, J.M.C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 529-534, 2008.

PAULIN, S.M.; JAGANNATHAN, A.; CAMPBELL, J.; WALLIS, T.S.; STEVENS, M.P. Net replication of *Salmonella* enterica serovars Typhimurium and Choleraesuis in

porcine intestinal mucosa and nodes is associated with their differential virulence. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 3950-3960, 2007.

PAULIN, S.M.; WATSON, P.R.; BENMORE, A.R.; STEVENS, M.P.; JONES, P.W.; VILLARREAL-RAMOS, B.; WALLIS, T.S. Analysis of *Salmonella* enterica serotype-host specificity in calves: Avirulence of *S. enterica* serotype Gallinarum correlates with bacterial dissemination from mesenteric lymph nodes and persistence in vivo. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 6788-6797, 2002.

PICKLER, L.; BEIRÃO, B.C.B.; HAYASHI, R.M.; DURAU, J.F.; LOURENÇO, M.C.; CARON, L.F.; SANTIN, E. Effect of sanguinarine in drinking water on *Salmonella* control and the expression of immune cells in peripheral blood and intestinal mucosa of broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, p. 430-438, 2013.

PICKLER, L.; HAYASHI, R.M.; LOURENÇO, M.C.; MIGLINO, L.B.; CARON, L.F.; BEIRÃO, B.C.B.; SILVA, A.V.F.; SANTIN, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 27-36, 2012.

QURESHI, M.A.; HEGGEN, C.L.; HUSSAIN, I. Avian macrophage: effector functions in health and disease. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 24, p. 103-119, 2000.

RABSCH, W.; HARGIS, B.M.; TSOLIS, R.M.; KINGSLAY, R.A.; HINZ, K.; TSCHÄPE, H.; BÄUMLER, A. Competitive Exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in poultry. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, p. 443-448, 2000.

RASFF. The rapid alert system for food and feed. Annual Report of European Commission. 60p. 2012. Disponível em: [http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff\\_annual\\_report\\_2012\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff_annual_report_2012_en.pdf). Acesso em 18 de dezembro de 2013.

RAVINDRAN, V.; HEW, L.I.; RAVINDRAN, G.; BRYDEN, W.L. A comparison of ileal digesta and excreta analysis for the determination of amino acid digestibility in feed ingredients for poultry. **British Poultry Science**, v. 40, p. 266-274, 1999.

ROSTAGNO, H.S. Tabelas Brasileiras para aves e suínos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011.

SASAI, K.; AITA, M.; LILLEHOJ, H.S.; MIYAMOTO, T.; FUKATA, T.; BABA, E. Dynamics of lymphocyte subpopulation changes in the cecal tonsils of chickens infected with *Salmonella* Enteritidis. **Veterinary Microbiology**, v. 74, p. 345-351, 2000.

SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. Métodos de pesquisa e nutrição de monogástricos. Jaboticabal: FUNEP, p. 92-129, 2007.

SHILOH, M.U.; NATHAN, C.F. Reactive nitrogen intermediates and the pathogenesis of *Salmonella* and mycobacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 35-42, 2000.

SILVA, D.J.; QUEIROZ A.C. Análise de Alimentos: Métodos químicos e biológicos. 3 ed. Viçosa: UFV, p. 235, 2002.

SOUZA A. Introduction to the special issue: *Salmonella* in foods: Evolution, strategies and challenges. **Food Research International**, v. 45, p. 451-454, 2012.

SMIRNOV, A.; SKLAN, D.;, UNI, Z. Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 736-742, 2004.

UTHE, J.J.; ROYAE, A.; LUNNEY, J.K.; STABEL, T.J.; ZHAO, S.H.; TUGGLE, C.K.; BEARSON, S.M.D. Porcine differential gene expression in response to *Salmonella* enterica serovars Choleraesuis and Typhimurium. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 2900-2914, 2007.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; DE SMET, I.; MAST, J.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strain. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 26, p. 355-364, 2002.

## **CAPÍTULO 2**

### **AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROBIÓTICOS NA RAÇÃO PARA CONTROLE DE *SALMONELLA* MINNESSOTA EM FRANGOS DE CORTE**

Este trabalho foi publicado na Archives of Veterinary Science. v.18, n.3, p.52-60, 2013 (Anexo 1)

## **AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROBIÓTICOS NA RAÇÃO PARA *Salmonella* Minnesota em frangos de corte**

**RESUMO.** Foi delineado o presente estudo com o objetivo de comparar a capacidade de diferentes probióticos via ração, em reduzir a colonização de *Salmonella* e interferir com a dinâmica celular na mucosa intestinal em frangos desafiados com *Salmonella enterica enterica* sorovar Minnesota (SM). Foram utilizados probiótico A constituído de *Bacillus subtilis* CCT 7711, probiótico B contendo *Lactobacillus acidophilus* + *Lactobacillus plantarium* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus bulgaricus* + *Enterococcus faecium* + *Streptococcus thermophilus* + *Bifidobacterium bifidum*, probiótico C constituído de *Bacillus subtilis* DSM 5750 e probiótico D *Enterococcus faecium*. Foi observado que todos os probióticos testados foram capazes de reduzir significativamente a contagem de *Salmonella* em suabes de cloaca, 48h após inoculação, e a contagem de *Salmonella* em ceco aos 35 dias, comparados ao controle positivo. Os probióticos testados não foram capazes de reduzir a contagem de *Salmonella* em papo aos 35 dias de idade das aves. Na mucosa do ceco das aves, verificou-se que todos os probióticos aumentaram as células CD4+ e CD8+ em relação ao grupo controle negativo aos 7 dias de vida; apenas os probióticos C e D reduziram significativamente os níveis de células CD8+ na mucosa cecal de frangos aos 35 dias, em relação ao grupo controle positivo. Com base nos resultados do presente estudo, verificou-se que os probióticos, utilizados neste estudo, tiveram diferentes efeitos sobre a redução na presença de SM e também afetaram de forma diferente a dinâmica celular da mucosa cecal das aves.

**PALAVRAS-CHAVE:** Células caliciformes, Células CD4+, células CD8+, *Salmonella* Minnesota, Probióticos.

## EVALUATION OF DIFFERENT PROBIOTICS IN DIET TO CONTROL *Salmonella* Minnesota IN BROILERS

**ABSTRACT.** The present study was designed to compare the ability of different probiotics, applied in feed, to reduce *Salmonella* colonization and interfere with the cellular dynamics in the intestinal mucosa of broilers challenged with *Salmonella enterica enterica* sorovar Minnesota (SM). The following probiotics were used: A composed of *Bacillus subtilis* CCT 7711; B containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus*, and *Bifidobacterium bifidum*; C consisting of *Bacillus subtilis* DSM 5750; and D with *Enterococcus faecium*. All tested probiotics were able to significantly reduce the *Salmonella* counts in cloacal swabs assessed at 48 h after inoculation when compared with the positive control. All probiotics were able to reduce the *Salmonella* counts in the cecum when compared to the positive control at 35 days. None of the tested probiotics reduced the *Salmonella* counts in the crop of broilers at 35 days of age. All probiotics induced an increase in the CD4 + and CD8+ cell counts in the cecum mucosa relative to the negative control group at 7 days of age; only probiotics C and D, reduced significantly the CD8 + cell counts in this same tissue of broilers at 35 days compared to positive control group. The results from this study indicated that the tested probiotics presented different effects on the reduction of SM counts and affected the cell dynamics in the cecum mucosa of broilers differently.

**KEY WORDS:** Goblet cells, CD4+ cells, CD8+ cells, *Salmonella* Minnesota, Probiotics.



## INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças transmitidas por alimentos, em especial as salmoneloses, são motivo de preocupação para a indústria avícola, pois bactérias deste gênero tem sido identificadas como uma das principais causas de surtos alimentares em seres humanos. Esses microrganismos podem causar desde infecções alimentares brandas até casos fatais e seu comportamento pode variar muito de acordo com o sorovar envolvido. A espécie *Salmonella enterica* subespécie *enterica* possui mais de 2500 sorovares descritos, cuja prevalência pode variar entre localidades, estados, e países, sendo recomendado estabelecer medidas de vigilância e identificação destes sorovares em seres humanos e aves de produção, com o propósito de desenvolver programas de controle nesta área (OIE, 2011).

A *Salmonella* Minnesota (SM) foi isolada pela primeira vez, em 1936, em um peru de três semanas de idade de uma granja no estado de Minnesota nos EUA (Edwards e Bruner, 1938). Naquele país, entre 1996 e 2006 foram diagnosticados casos de SM envolvendo toxinfecção em seres humanos (CENTERS OF DISEASE CONTROL, 2008).

No último relatório anual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasileira (ANVISA, 2007), SM esteve envolvida em 1,2% dos casos de salmoneloses, sendo que a *Salmonella* Enteritidis representou o principal sorovar isolado com 48,8%. A SM também apareceu no sistema de alerta rápido da Europa, em carne de frango exportada do Brasil para a Holanda, no ano de 2008 (RASFF, 2008). Este sistema de comunicação destaca a importância da salmonelose, como barreira ao comércio internacional de alimentos.

Em trabalho de tipificação de *Salmonella*, em amostras positivas de frangos de corte, realizadas pelo Ministério da Agricultura do Brasil, percebeu-se elevação

do percentual de SM encontrado entre o período de 2009/2010 que foi de 9,38% comparado ao período anterior, 2004/2008, onde a positividade para SM foi de 0,96% (Freitas, 2011). Este aumento da SM foi observado, principalmente, em aves criadas na região Centro-Oeste do país mostrando que o comportamento dos diferentes sorovares tem relação com características regionais.

Um dos fatos que dificultam o controle deste microrganismo em plantéis avícolas refere-se à falta de sinais clínicos e/ou lesões, pois na maioria das vezes, a ave é portadora assintomática. Além disso, estudos epidemiológicos ao longo do tempo mostraram que pode existir relação de exclusão competitiva entre diferentes sorovares. Este comportamento de alternância entre sorovares distintos indica que o nicho ecológico de um sorovar específico pode ser ocupado por outro sendo que o controle de um sorovar pode interferir na prevalência de outros (Rabsch et al., 2000).

Por todos estes aspectos, as empresas avícolas empregam um programa de biossegurança que envolve o uso de vacinas, desinfetantes, probióticos, prébióticos e ácidos orgânicos no sentido de se controlar a salmonelose.

Os probióticos, em especial, são produtos compostos de microrganismos vivos com capacidade de se instalar e proliferar no trato intestinal beneficiando o hospedeiro através do equilíbrio da microbiota natural e que já foram descritos como capazes de controlar *Salmonella* (Reid e Friendship, 2002; Dahiya et al., 2006). Os mecanismos de ação descritos para explicar o funcionamento dos probióticos são: competição por sítios de ligação (Jin et al., 1997), produção de substâncias antimicrobianas (Tagg et al., 1976; Lewenstein et al., 1979; Lauková et al., 2004), competição por nutrientes e estímulo ao sistema imunológico (Fuller e Gibson, 1997; Noujaim et al., 2008; Mouni et al., 2009; Lee et al., 2010).

No entanto, ainda existem muitas dúvidas sobre o mecanismo da ação de probióticos em função da grande diversidade de composição dos produtos disponíveis comercialmente, e também da interação específica entre esta microbiota e mucosa intestinal das aves.

O objetivo do presente estudo foi comparar a capacidade de diferentes probióticos comerciais na redução da excreção de *Salmonella*, em aves desafiadas com *Salmonella enterica enterica* sorovar Minnesota (SM). Além disso, foi investigado o efeito dos diferentes probióticos sobre a dinâmica de células imunológicas na mucosa intestinal de aves.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram alojados 120 frangos de corte da linhagem COBB do 1º ao 35º dia de idade, divididos em delineamento inteiramente casualizado com 6 tratamentos de acordo com a Tabela 7.

**Tabela 7. Descrição dos tratamentos**

Tratamento	Produto	Composição	Conc. Na Ração
T1	Controle Negativo	Ração Basal	-
T2	Controle Positivo	Ração Basal	-
T3	Probiótico A	<i>Bacillus subtilis</i> CCT 7711	$4,5 \times 10^5$ UFC/g
T4	Probiótico B	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCIMB 30184, <i>Lactobacillus plantarium</i> NCIMB 30188, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> NCIMB 30187, <i>Lactobacillus bulgaricus</i> NCIMB 30186, <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 30179, <i>Streptococcus thermophilus</i> NCIMB 30189 e <i>Bifidobacterium bifidum</i> NCIMB 30183	$3 \times 10^5$ UFC/g
T5	Probiótico C	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 5750	$1,6 \times 10^6$ UFC/g
T6	Probiótico D	<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	$2,0 \times 10^6$ UFC/g

As aves de cada tratamento foram alojadas em sala, com pressão negativa, separadas, idênticas e localizadas lado a lado para evitar a contaminação entre os diferentes probióticos.

Estas salas foram previamente limpas, desinfetadas e a cama de maravalha utilizada foi previamente esterilizada em autoclave 121° C/ 15 minutos. Foi realizado teste de esterilidade nas salas, equipamentos e cama antes do início do experimento. Na chegada dos animais foi realizada eutanásia e necropsia de cinco animais para coleta de fígado e ceco e realização de análise de presença/ausência de *Salmonella*.

Os animais foram mantidos em temperatura ideal de conforto para a idade das aves de acordo com manual da linhagem COBB, com fornecimento de água e ração à vontade, sendo alimentadas com dietas peletizadas e balanceadas em níveis iguais aos recomendados pelo NRC (1994).

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA SCA) da Universidade Federal do Paraná sob Protocolo n° 34-2011.

Aos 15 dias de idade os animais dos tratamentos 2 ao 6 foram inoculados com 1 mL de suspensão de *Salmonella* Minnesota na concentração  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL por via oral.

Para o preparo do inóculo, uma colônia pura de SM, isolada de frangos de corte da região do Mato Grosso do Sul, foi retirada do Agar estoque e incubada em solução de BHI (Brain Heart Infusion) por 24h a 37°C. Esta suspensão foi diluída até a concentração 0,5 da Escala de MacFarland e aferida em espectrofotômetro, previamente descrito por Pickler et al. 2012.

Para análise microbiológica foram realizados suabes de cloaca 48h após inoculação, sendo 5 amostras por tratamento (cada amostra foi um *pool* de 3

animais) para análise de contagem de *Salmonella*. Aos 7 dias de idade (5 animais por tratamento) e aos 35 dias de idade (10 animais por tratamento) foram eutanasiados, por deslocamento cervical e necropsiados para coleta de papo e ceco de forma asséptica e posterior análise de *Salmonella*.

Foram realizadas também coletas de fragmentos de íleo e ceco de 5 animais por tratamento fixados em formol tamponado 10% para análise de células caliciformes e fragmentos dos mesmos segmentos congelados em nitrogênio líquido para posterior análise de linfócitos T CD4+ e CD8+ através de imunoistoquímica.

Para realização do procedimento de contagem de *Salmonella* procedeu-se como Pickler et al., 2012. Os suabes de cloaca, os papos e os cecos foram diluídos em água peptonada 2% em proporção de 1:10. Retirou-se 1 mL da solução de água peptonada 2% que foi pipetado no tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1% e assim sucessivamente até a diluição  $10^{-3}$ . Posteriormente retirou-se 100  $\mu$ L de cada diluição, plaqueou-se em duplicata em meio XLD (Xylose Lysine Desoxycholate) e com uma alça de Drigalsky estéril espalhou-se o líquido na placa. As placas foram incubadas em estufa regulada a 35°C por 24h e submetidas à posterior contagem das colônias típicas.

A solução inicial de água peptonada 2% foi incubada a 35°C por 24h, em caso de não ter ocorrido crescimento de colônias típicas de *Salmonella* sp. em plaqueamento direto, retirou-se 100  $\mu$ L da solução inicial em água peptonada 2% e acrescentou-se em um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, incubou-se em estufa regulada a 42°C por 24h para confirmação da positividade ou negatividade da amostra.

Os resultados das contagens de colônias foram expressos de acordo com Procedimentos de Contagem de Colônia de acordo com a Normativa nº62 publicada em 26 de agosto de 2003 (Brasil - MAPA).

Para as análises de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> por meio de imunohistoquímica, as amostras foram incluídas em gel Tissue-Tek O. C. T. (Miles, Elkhart IN, US), congeladas em nitrogênio líquido, seccionadas com 5µm de espessura em um aparelho criostato e fixadas em lâminas carregadas positivamente em acetona 100%. Em seguida foi realizada a re-hidratação com PBS 0,1M pH 7,6, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos e proteína bloqueadora por 8 minutos. Os anticorpos primários utilizados foram Anti-CD4 (CT-4 Southern Biotech 1:100) e Anti-CD8 (CT-8 Southern Biotech 1:100), incubados por 90 minutos a 37°C. Para detecção da reação foi utilizado anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho combinados em sistema de amplificação, kit ADVANCE<sup>®</sup> por 30 minutos. Para revelação da reação foi utilizado cromógeno, kit DAB<sup>®</sup> por 30 segundos. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Meyer (adaptado de Jeurissen et al., 2000).

Campos microscópicos com presença de células positivas foram quantificados em microscopia de luz com ampliação de 100X (Olympus BX41 Olympus America INC., NY, USA). Foram analisados 20 campos para cada grupo experimental e para cada marcador de superfície celular.

As amostras de íleo ceco foram processadas rotineiramente para histologia e coradas com Alcian Blue. Foi avaliada a contagem de células caliciformes, com leitura de 20 campos por grupo experimental em um aumento de 100X (Olympus BX41 Olympus America INC., NY, USA) (Smirnov *et al.*, 2004).

Foi utilizado o programa estatístico StatView for Windows Copyright® 1998 (SAS Institute Inc., NC, USA). As contagens de colônias de *Salmonella* foram transformadas em Log 10 para análise estatística. Todos os resultados foram submetidos à ANOVA, teste de Fischer à 5% de probabilidade.

## RESULTADOS

As amostras de fígado e ceco coletadas no primeiro dia e os papos e cecos coletados aos 7 dias de idade foram todas negativas para análise de *Salmonella* sp. O tratamento negativo não inoculado permaneceu negativo para SM na cama e órgãos durante todo o período indicando a eficiência do sistema de isolamento entre as câmaras que separavam os tratamentos.

Os resultados da contagem de colônias de *Salmonella* (média  $\pm$  desvio padrão) em suabe de cloaca 48h após inoculação, papo e ceco aos 35 dias de idade dos diferentes tratamentos estão expressos na Tabela 8. Todos os probióticos testados foram capazes de reduzir significativamente a contagem de *Salmonella* em suabes 48h após inoculação com relação ao controle positivo. Além disso, todos os probióticos foram capazes de reduzir a contagem de *Salmonella* em ceco aos 35 dias quando comparado ao controle positivo. Por outro lado, os probióticos testados não foram capazes de reduzir a contagem de *Salmonella* em papo aos 35 dias de idade das aves.

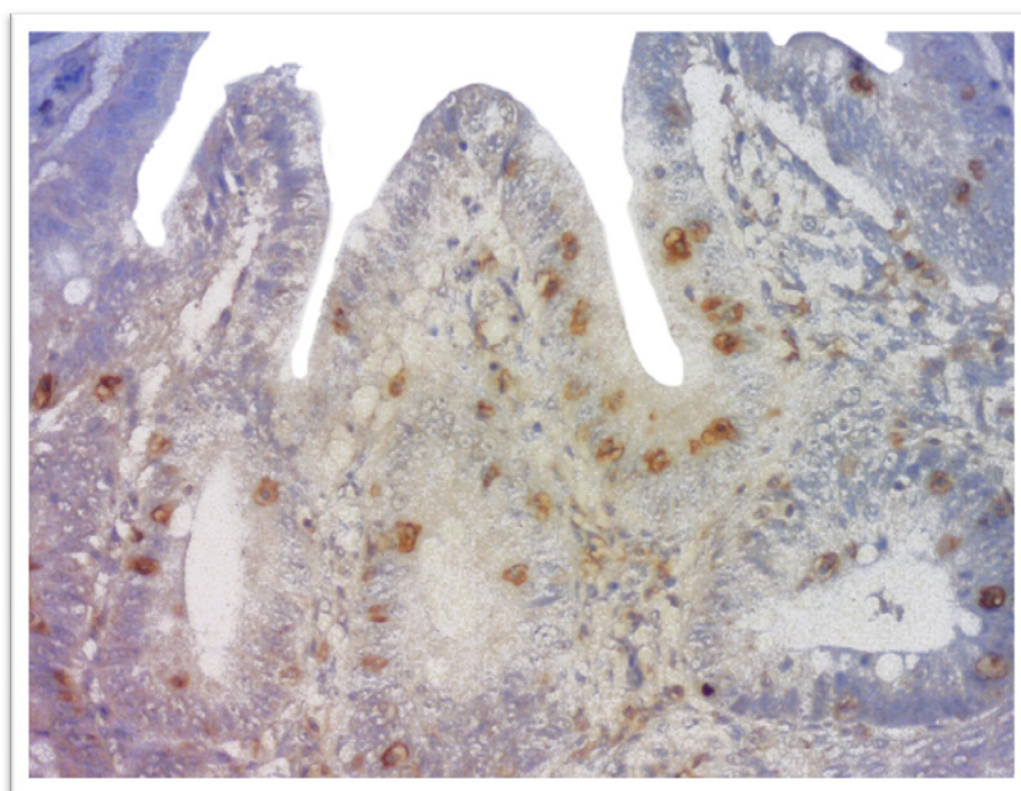
A Tabela 9 expressa os resultados da contagem de células caliciformes, células CD4+ e CD8+ na primeira coleta (7 dias de idade) em íleo e ceco de frangos de corte nos diferentes tratamentos. A Tabela 10 expressa os resultados da contagem de células caliciformes e células CD4+ e CD8+ na segunda coleta (35 dias de idade) no íleo e ceco de frangos de corte nos diferentes tratamentos. A

figura 3 demonstra um campo cortes histológicos do ceco das aves com aplicação da técnica de imunoistoquímica para células CD4+.

**Tabela 8. Média e desvio padrão da contagem de colônias de *Salmonella* em suabe cloacal 48h após inoculação, papo e ceco de frangos de corte aos 35 dias de idade nos diferentes tratamentos (Resultados expressos em Log10 UFC/g).**

Tratamento	Média e Desvio Padrão (Suabe 48h PI)	Média e Desvio Padrão (Papo)	Média e Desvio Padrão (Ceco)
Controle Negativo	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	0,00±0,00 c
Controle Positivo	3,95±2,24 a	0,87±0,50 ab	4,30±4,28 a
Probiótico A	1,00±0,00 b	1,10±1,07 a	1,03±0,72 bc
Probiótico B	1,45±1,62 b	0,73±0,74 ab	2,31±1,61 b
Probiótico C	0,60±0,55 b	0,70±0,48 ab	1,63±1,10 b
Probiótico D	1,51±1,14 b	0,67±0,80 ab	1,12±1,20 bc
<b>Valor de P</b>	<b>0,001</b>	<b>0,024</b>	<b>0,000</b>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$



**Figura 3: Fotomicrografia dos cecos das aves com 35 dias de vida demonstrando as células CD4+ coradas presentes no intestino (Imunoistoquímica, 40X).**



**Tabela 9. Contagem (média e desvio padrão) de células caliciformes, CD4+, CD8+ e relação CD4+:CD8+ por campo em íleo e ceco de frangos de corte aos 7 dias de idade nos diferentes tratamentos (aumento de 100X).**

Tratamento	Íleo				Ceco			
	Caliciformes	CD4+	CD8+	CD4+:CD8+	Caliciformes	CD4+	CD8+	CD4+:CD8+
<b>C. Negativo</b>	41,40±8,43 c	4,30±3,71 b	7,90±2,33	0,63±0,62	10,30±2,34 c	8,3±3,30 c	10,3±4,06 c	0,87±0,40 a
<b>C. Positivo</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>Probiótico A</b>	62,15±6,80 a	5,30±3,46 ab	7,40±4,81	1,25±2,02	14,10±2,84 ab	16,1±4,86 ab	17,3±2,75 a	0,98±0,41 b
<b>Probiótico B</b>	49,35±6,05b	9,40±4,45 a	6,60±4,16	1,69±0,94	14,50±2,62 ab	19,9±3,54 a	15,2±3,15 ab	1,36±0,38 b
<b>Probiótico C</b>	57,25±6,94 a	8,80±4,56 ab	6,30±2,94	1,62±1,11	15,70±2,53 a	13,0±4,52 bc	11,8±3,58 b	1,22±0,63 b
<b>Probiótico D</b>	62,50±5,65 a	4,80±2,44 ab	4,90±2,02	1,21±0,85	12,80±2,53 b	18,4±3,56 a	11,7±2,86 b	1,70±0,70 b
<b>Valor de P</b>	<0,001	0,008	0,355	0,292	<0,001	<0,001	<0,001	0,016

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$

**Tabela 10 – Contagem (média e desvio padrão) de células caliciformes, CD4+, CD8+ e relação CD4+:CD8+ por campo no íleo e ceco de frangos de corte aos 35 dias de idade (aumento de 100X).**

Tratamento	Íleo				Ceco			
	Caliciformes	CD4+	CD8+	CD4+:CD8+	Caliciformes	CD4+	CD8+	CD4+:CD8+
<b>C. Negativo</b>	64,5±14,95	16,2±6,47 a	6,9±4,79 b	3,76±3,08 a	10,85±6,09	19,6±6,09 ab	11,5±3,57 c	2,02±1,31 a
<b>C. Positivo</b>	60,9±12,76	15,5±5,58 a	11,4±6,36 ab	1,89±1,75 ab	13,70±5,36	23,7±8,35 ab	21,9±5,68 a	1,12±0,40 ab
<b>Probiótico A</b>	52,95±11,32	12,7±4,22 ab	10,9±3,98 ab	1,39±0,91 b	11,55±8,02	17,0±3,74 b	19,9±6,15 ab	0,92±0,32 b
<b>Probiótico B</b>	58,35±16,9	15,7±4,32 a	13,3±2,83 a	1,26±0,55 b	11,90±4,41	24,6±4,83 ab	22,4±6,20 a	1,20±0,51 ab
<b>Probiótico C</b>	63,0±11,50	10,8±5,03 ab	6,8±2,53 b	1,85±1,12 ab	13,70±4,65	25,3±7,91 a	13,1±4,23 bc	2,05±0,70 a
<b>Probiótico D</b>	62,0±9,56	7,9±3,96 b	9,2±4,68 ab	1,06±0,83 b	12,20±4,47	21,8±3,12 ab	14,5±4,65 bc	1,72±0,89 ab
<b>Valor de P</b>	0,0813	0,002	0,008	0,006	0,519	0,024	<0,001	0,003

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes para  $P \leq 0,05$

## DISCUSSÃO

Nurmi e Rantala (1973) foram pioneiros em descrever o uso do mecanismo chamado de exclusão competitiva (EC) no controle de *Salmonella*. Esses pesquisadores demonstraram que a colonização precoce com bactérias de aves adultas em aves jovens era capaz de proteger contra a colonização destas por *Salmonella*. Em princípio esse mecanismo foi associado à produção, por parte de microrganismos oferecidos às aves jovens, de ácidos voláteis que seriam capazes de inibir o crescimento de *Salmonella*. Posteriormente, Soerjadi et al. (1981) demonstraram que a proteção ao desafio oral por *Salmonella* iniciava aparentemente 1 a 2 horas após o tratamento com a microbiota protetora, o que indicaria que não somente a presença de ácidos orgânicos voláteis, mas também a competição por sítios de ligação poderia ser importante no mecanismo de inibição de *Salmonella*.

No que se refere ao controle de SM, foi verificado que todos os produtos utilizados foram efetivos em diminuir a excreção de SM em suabes de cloaca de aves 48h após a inoculação em relação ao grupo inoculado que não recebeu nenhum probiótico. Em relação a porcentagem de redução de SM, aos 35 dias, em ceco das aves com relação ao controle positivo, foi de 76,04% no probiótico A, 46,27% no probiótico B, 62,09% no probiótico C e 73,45% no probiótico D.

O efeito inibitório de probióticos sobre a população de enterobactérias patogênicas por meio do mecanismo de exclusão competitiva é bastante documentado na literatura (Reid e Friendship, 2002; Dahiya et al., 2006), e pode ser uma possível explicação para efeito de redução de SM observado no presente estudo pelos diferentes probióticos.

Na análise da dinâmica celular na mucosa intestinal de aves frente aos diferentes probióticos, foi observado que todos aumentaram a quantidade de células caliciformes na mucosa de íleo e ceco das aves aos 7 dias de idade. As células caliciformes, presentes nas vilosidades intestinais são responsáveis pela manutenção da camada de muco que atua como meio de proteção físico e biológico e também é um componente da resposta imunológica inata que é regulada em resposta à inflamação e infecção (Uni et al., 2003), assim acredita-se que a presença dos probióticos na dieta das aves pode interferir na resposta imunológica inata representada pela expressão de células produtoras de muco.

A inclusão/exclusão imunológica está relacionada com a produção de IgA pelo hospedeiro que facilita ou dificulta a adesão de bactérias na mucosa intestinal. Quando o microrganismo é benéfico ocorre uma baixa produção de IgA, que se liga ao agente e facilita a adesão deste na mucosa intestinal formando um biofilme que protege contra infecção por outros microorganismos e evita a translocação dessas bactérias através da mucosa do hospedeiro (inclusão imunológica). Por outro lado, microrganismos que causam lesão, estimulam a produção de altos níveis de IgA que inibem o agente e impedem a adesão deste ao hospedeiro (exclusão imunológica) (Everret et al., 2004).

O uso de probióticos na dieta também interferiu com a presença de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na mucosa intestinal das aves. Segundo Van Immerseel et al. (2002), o encontro de células epiteliais especializadas com microorganismos, rapidamente estimula a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias que atraem células imunológicas inatas, como granulócitos e macrófagos, capazes de desencadear novas reações imunológicas, como o aparecimento de linfócitos T auxiliares (células CD4<sup>+</sup>).

As células CD4<sup>+</sup> estão relacionadas ao início da resposta imunológica específica, sendo estas responsáveis também pela modulação imunológica. Essas células são chamadas de linfócitos T auxiliares e podem levar a resposta Th1 ou Th2 com produção de anticorpos e também interferem com a imunidade celular (Fearon e Locksley, 1996). Por outro lado, Linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) estão diretamente relacionados à eliminação de patógenos intracelulares sendo responsáveis por esta via da imunidade celular (Zou et al., 2006).

No presente estudo, na mucosa do ceco das aves, que parece ser o sítio de maior atuação dos probióticos, verificou-se que todos aumentaram as células CD4<sup>+</sup> em relação ao grupo controle negativo aos 7 dias de vida das ave. Quanto às células CD8<sup>+</sup> foi verificado que os probióticos A e B aumentaram os níveis de células CD8<sup>+</sup> na mucosa em relação ao grupo que não consumiu probióticos na dieta. Alguns autores (Noujaim et al., 2008; Mouni et al., 2009; Lee et al., 2010) citam que algumas bactérias como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium bifidum*, presentes no probiótico B podem atuar estimulando o aumento de CD8<sup>+</sup> específico.

Após o desafio com SM, foi observado que as aves que não consumiram os probióticos na dieta apresentaram aumento no número de células CD8<sup>+</sup> na mucosa do ceco quando comparado ao grupo não desafiado. O mesmo ocorreu em aves desafiadas que foram alimentadas com A e B. Como estes produtos foram capazes de aumentar a presença destas células na mucosa, verificado na análise de 7 dias de idade, não se pode dizer que este efeito deveu-se ao estímulo isolado da SM.

Por outro lado, foi verificada redução de células CD8<sup>+</sup> na mucosa do ceco das aves alimentadas com os probióticos C e D em relação ao grupo controle desafiado, e isso pode ser associado a redução de bactérias patogênicas no lúmen intestinal como visto por seu efeito sobre a presença de SM no ceco de aves alimentadas por

estes probióticos. Scharek et al. (2005) observaram que redução na contagem de células CD8+ em suínos pode ser associada a redução na contagem de *E. coli*. Em verdade, os probióticos C e D diminuíram as células CD8+ mas aumentaram as células CD4+ e isso também pode ter interferido na resposta a SM, pois sabe-se que as células CD4+ também podem atuar na resposta imunológica humoral, pois são elas que apresentam os antígenos para os linfócitos B se diferenciarem em células produtoras de anticorpos como IgA.

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, verificou-se que também ocorre interferência dos probióticos da dieta com respostas imunológicas na mucosa intestinal das aves. Estes resultados sugerem que o efeito dos probióticos utilizados neste estudo sobre a redução na presença de SM pode ser resultado de uma associação de mecanismo de exclusão competitiva e imunomodulação. Entretanto foram verificadas diferenças na atuação de cada probiótico sobre presença de células imunológicas na mucosa intestinal de frangos, sendo necessários maiores estudos para se compreender esse efeito imunomodulatório dos probióticos.

É possível concluir com o presente estudo que diferentes probióticos apresentam diferentes capacidades de afetar a colonização de *Salmonella* em aves desafiadas e alteram a dinâmica celular da mucosa cecal das aves.

## REFERÊNCIAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2007). **Relatório anual 2007**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/Relatorio\\_GGALI\\_2007.pdf](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/Relatorio_GGALI_2007.pdf) Acesso em 16 de agosto de 2012.

BRASIL - MAPA, Instrução Normativa nº62 publicada em 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, Brasília, 2003.

CENTERS OF DISEASE CONTROL. *Salmonella* Surveillance: **Annual Summary**, 2006. Atlanta, Georgia: US Department of health and Human Services, CDC, 101p, 2008.

DAHIYA, J.P.; WILKIE, D.C. ; VAN KESSEL, A.G. ; DREW, M.D. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. **Animal Feed Science Technology**, v. 129, p. 60-88, 2006.

EDWARDS, P.R.; BRUNER, D.W. Two new *Salmonella* isolated from Fowls. **Journal of Hygiene**, v. 38, p. 716-720, 1938.

EVERETT, M.L.; PALESTRANT, D.; MILLER, S.E. Immune exclusion and immune inclusion: A new mode of host-bacterial interactions in the gut. **Clinical Applied Immunology Reviews**, v. 4, p. 321-332, 2004.

FEARON, D.T.; LOCKSLEY, R.M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, v. 272, p. 50-54, 1996.

FREITAS, J. Evolução de sorovares – Modelo de banco de cepas. Seminário Internacional de Salmoneloses Aviárias. Rio de Janeiro, RJ, 2011.

FULLER, R.; GIBSON, G.R. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 32, p. 28-31, 1997.

JEURISSEN, A.H.M.; CLAASSEN, E.; BOONSTRA-BLOM, A.G.; VERVELDE, L.; JANSE, E. Immunocytochemical techniques to investigate the pathogenesis of infectious micro-organisms and the concurrent immune response of the host. **Comparative Immunology Microbiology Disease**, v. 24, p. 141-151, 2000.

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Probiotics in poultry: modes of action. **World Poultry Science Journal**, v. 53, p. 351-68, 1997.

LAUKOVÁ, A.; GUBA, P.; NEMCOVÁ, R.; MAREKOVÁ, M. Inhibition of *Salmonella enterica* serovar Düsselndorf by enterocin A in gnotobiotic Japanese quails. **Veterinary Medicine Czech**, v. 49, p. 47–51, 2004.

LEE, K.; LILLEHOJ, H.S.; SIRAGUSA, G.R. Direct-fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. **Journal of Poultry Science**, v. 47, p. 106-114, 2010.

LEWENSTEIN, A.; FRIGERIO, G.; MORONI, M. Biological properties of sf68, a new approach for the treatment of diarrhoeal diseases. **Current Therapeutic Research**, v. 26, p. 967–981, 1979.

MOUNI, F.; AISSI, E.; HERNANDEZ, J.; GOROCICA, P.; BOUQUELET, S.; ZENTENO, E.; LASCURAIN, R.; GARFIAS, Y. Effect of *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 cytoplasmatic fraction on human immune cells. **Immunological Investigation**, v. 38, n. 1, p. 104-15, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1994. Nutrient requirements of poultry. 9th rev. ed. National Academy Press: Washington, D.C.

NOUJAIM, J.C.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T.; OKAMOTO, A.S.; AMORIM, R.L.; TORRES NETO, R. Detection of T lymphocytes in intestine of broiler chicks treated with *Lactobacillus* spp. and challenged with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Poultry Science**, v. 87, p. 927-933, 2008.

NURMI, E. V.; RANTALA, M. New aspects of Salmonella infection in broiler production. **Nature**, v. 241, p. 210-211, 1973.

OIE 2011. World Organisation for Animal Health , 2011. **Terrestrial Animal Health Code**. 21° ed. 435 p. Disponível em: <http://www.oie.int/doc/ged/D10905.PDF>. Acessado em 16 de agosto de 2012.

PICKLER, L.; HAYASHI, R.M.; LOURENÇO, M.C.; MIGLINO, L.B.; CARON, L.F.; BEIRÃO, B.C.B.; SILVA, A.V.F.; SANTIN, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 27-36, 2012.

RABSCH, W.; HARGIS, B.M.; TSOLIS, R.M; KINGSLAY, R.A.; HINZ, K.; TSCHÄPE, H.; BÄUMLER, A. Competitive Exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in poultry. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, p. 443-448, 2000.

RASFF. The rapid alert system for food and feed. Annual report of European Commission, 56 p., 2008. Disponível em: [http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2008\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2008_en.pdf). Acessado em 16 de agosto de 2012.

REID, G.; FRIENDSHIP R. Alternative to antibiotic use: probiotics for the gut. **Animal Biotechnology**, v. 13, p. 97-112, 2002.

SCHAREK, L.; GUTH, J.; REITER, K.; WEYRAUCH, K.D.; TARAS, D.; SCHIERAK, P.; SCHIMDT, M.F.G.; WIELER, L.H.; TEDIN, K. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 105, p. 151–161, 2005.

SMIRNOV, A.; SKLAN, D.; UNI, Z. Mucin dynamics in the chick small intestines are altered by starvation. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 736-742, 2004.

SOERJADI, A.S.; STEHMAN, S.M.; SNOEYENBOS, G.H.; WEINACK, O.M.; SMYSER, C.F.; Some measurements of protection against paratyphoid *Salmonella* and *Escherichia coli* by competitive exclusion in chickens. **Avian Diseases**, v. 24, p. 706–712, 1981.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 40, p. 722-56, 1976.

UNI, Z.; SMIRNOV, A.; SKLAN, D. Pre- and Post hatch development of goblet cells in the broiler small intestine: effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, v. 82, p. 320–327, 2003.

VAN IMMERSEEL, F.; BUCK, J.; SMET, I.; MAST, J.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLA, R. The effect of vaccination with a *Salmonella* enteritidis aroA mutant on early cellular responses in caecal lamina propria of newly-hatched chickens. **Vaccine**, v. 20, p. 3034–3041, 2002.

ZOU, F.C.; JIANG, Y.P.; NIE, K.; SHANG, Y.X.; LI, H.L. Dynamic changes of CD4+ and CD8 T lymphocyte subpopulations in blood of chicks infected with *Eimeria tenella*. **Poultry Husbandry Disease Control**, v. 1, p. 4–7, 2006



## **ESTUDO DE CASO**

### **PRESENÇA DE *Salmonella* spp. EM CAMA REUTILIZADA DE FRANGOS DE CORTE**

Este estudo de caso foi publicado na Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, v. 27, p.12-17, 2014 (Anexo 2)

## **PRESENÇA DE SALMONELLA SPP. EM CAMA REUTILIZADA DE FRANGOS DE CORTE**

**RESUMO.** A reutilização de cama aviária por vários lotes é uma prática do moderno sistema de produção de aves e está baseada na redução do impacto ambiental, na escassez do material de reposição e na diminuição nos custos de produção. Porém, esta prática é associada com riscos sanitários como a presença de patógenos como *Salmonella* spp. nos lotes de frango. **Objetivo:** na tentativa de esclarecer se há risco sanitário, uma pesquisa foi realizada para detectar a presença de *Salmonella* spp. na cama reutilizada e fermentada de produtores de frango. **Métodos:** foram analisadas 1280 amostras de cama de diferentes produtores do Centro-oeste do Brasil durante sete lotes consecutivos. As amostras de cama foram coletadas com aves na idade entre 28 e 32 dias usando pró-pés descartáveis e a presença de *Salmonella* spp. foi determinada por isolamento bacteriológico. Durante o intervalo dos lotes a cama foi tratada antes da reutilização por meio da cobertura através de uma lona plástica preta em toda a superfície interna do aviário por sete dias. **Resultados:** foi observada uma diminuição significativa no número de amostras positivas de *Salmonella* spp. com a reutilização e fermentação das camas entre os lotes, em relação ao primeiro lote. Isto indica que o processo de reutilização, seguido de fermentação anaeróbia do material da cama pela comunidade de microrganismos afetou a sobrevivência de bactérias patogênicas como *Salmonella* spp. **Conclusões:** este estudo evidencia que o reuso da cama é seguro e recomendado quando realizado após o processo de fermentação no intervalo do lote em relação à presença de *Salmonella* spp, pois lotes criados com cama reutilizada apresentaram percentual de positividade menor do que ao da cama nova.

**Palavras chave:** compostagem, digestão anaeróbica, tratamento de cama, microbiota.

## PRESENCE OF *SALMONELLA* SPP. IN REUSED BROILER LITTER

**Background:** reutilization of poultry litter for multiple broiler flocks is a common practice in modern production systems due to the increasing scarcity and cost of litter materials, and the necessity to reduce environmental impact. However, this practice has been associated with sanitary risks, such as the presence of *Salmonella* spp. in broiler meat. **Objective:** a study was conducted to detect the presence of *Salmonella* spp. in reused litters. **Methods:** 1280 litter samples from Midwestern Brazilian poultry farms were analyzed during seven consecutive flocks. Samples were collected from flocks aged from 28 to 32 days. Disposable shoe covers were used for sample collections. Presence of *Salmonella* spp. was determined by microbiological isolation. During the interval period between flocks the litter was fermented prior to its reuse by covering it with a black plastic canvas for seven days. **Results:** positive samples for *Salmonella* spp. decreased when the number of litter reuses increased compared with the first reuse of the litter. An anaerobic digestion process with biological and physicochemical changes in the litter material and microbial communities may explain the low survival of pathogenic bacteria such as *Salmonella* spp. **Conclusions:** our study demonstrates that litter reused after the fermentation process is a safe and recommended practice in relation to the presence of *Salmonella* spp, because flocks raised in reused litter showed less level of positive percentage than flocks raised in new litter.

**Key words:** anaerobic digestion, composting, litter treatment, microbiota.

## INTRODUÇÃO

Vários lotes de frangos de corte são comumente criados em camas reutilizadas no moderno sistema de produção de aves. Neste sistema, as aves são alojadas desde primeiro dia de vida logo após o nascimento diretamente na cama reutilizada (Volkova et al., 2009). Manejo e processamento desta cama é necessário para diminuir a carga microbiana antes de reutilizar a mesma (Vizzier Thaxton et al., 2003). Com este propósito, a fermentação tem sido proposta como uma alternativa de garantir a qualidade microbiológica da cama reutilizada (Macklin et al., 2006). Entretanto, discussões em relação ao potencial risco sanitário associado a esta prática tem sido levantados.

Muitos microrganismos na cama de frango são originados dos excrementos das aves, inclusive as *Enterobacteriaceae* e outras bactérias com capacidade zoonótica (Fries et al., 2005; Cook et al., 2012). A contínua exposição à bactérias indesejáveis da cama pode aumentar a contaminação do trato digestivo das aves. Embora a maioria das enterobacterias não causem problemas para as aves, elas podem tornar-se um problema sanitário para os humanos, pois durante o processo de abate ocorre a contaminação das carcaças quando elas entram em contato acidentalmente com fezes do intestino infectado ou material presente no papo, comprometendo a segurança do alimento e a saúde pública (Haapapuro et al., 1997).

Transferência de patógenos na cadeia alimentar também pode ocorrer quando a cama é utilizada no solo como um fertilizante orgânico, resultando em contaminação do ambiente (Lovanh et al., 2007; Volkova et al., 2009). A contaminação da cama pode promover a perpetuação das doenças de um lote a

outro quando utilizada mais de uma vez. Por esta razão, a reutilização da cama não é recomendada quando ocorrem episódios sanitários.

Independente do destino da cama (reutilização por sucessivos lotes ou uso como fertilizante), o tratamento para reduzir ou inativar bactérias é vital para diminuir riscos tanto para os animais quanto para os humanos. Portanto, o tratamento da cama reutilizada é considerado condição necessária para boas práticas de produção de frangos de corte (Pope e Cherry, 2000; Larrison et al., 2010). A reposição total da cama após todo lote resulta em considerável impacto ambiental devido a alta demanda de substrato requerido (por exemplo maravalha, palha ou serragem) e com a destinação deste resíduo no ambiente (Pandey e Soupir, 2011; Pote et al., 2011; Watts et al., 2011). Além disso, a troca da cama após a criação de cada lote representa um significativo aumento no custo de produção.

O objetivo deste estudo foi o de avaliar a presença de *Salmonella* em camas reutilizadas após a fermentação por meio da lona estendida.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Experimento**

Um total de 1280 amostras de cama de vários produtores de frangos do Centro-oeste do Brasil foram analisadas após reutilização por sete lotes consecutivos. A população corresponde a 196 produtores. Intervalo de 14 dias.

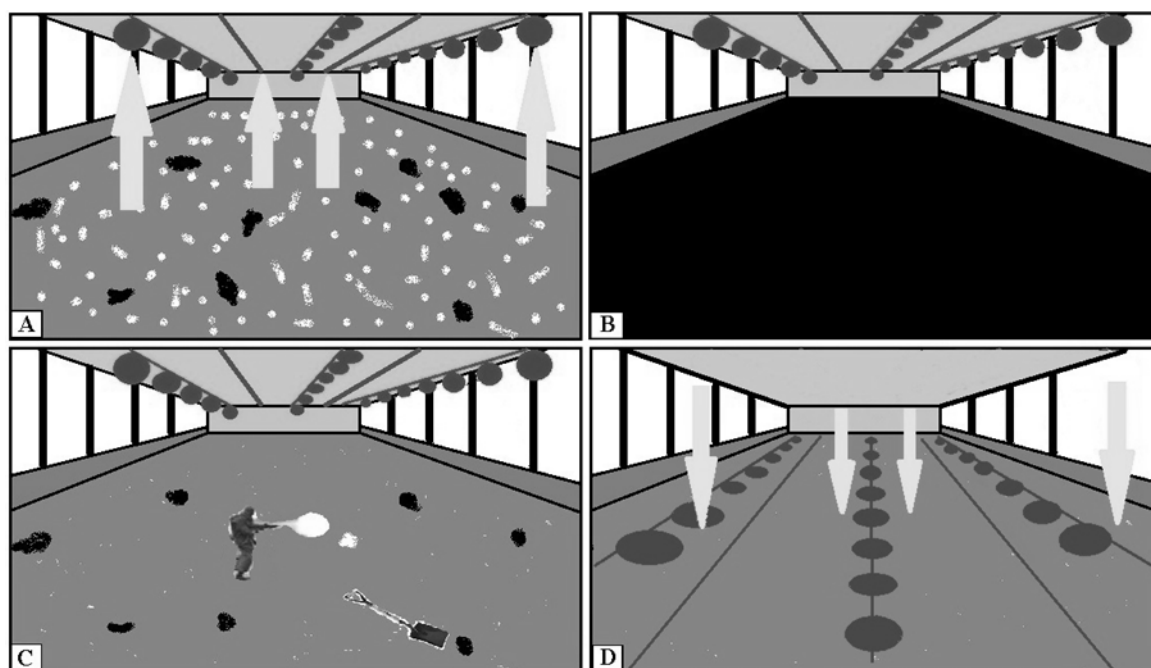
### **Manejo da cama**

O procedimento realizado está brevemente descrito a seguir:

1. Limpeza dos equipamentos (comedouros, bebedouros, etc.) com água e detergente logo após o carregamento do lote. Todo equipamento foi suspenso (Figura 4 A).

2. Umidecimento da cama (20 litros/m<sup>2</sup>).
3. Afastar a cama para criar um espaço entre as muretas e a cama na lateral interna do aviário.
4. Cobrir a cama com lona para evitar a entrada de ar (Figura 4B).
5. Remover a lona após sete dias de fermentação descartando crostas e mexendo a cama.
6. Aplicar o lança chamas uniformemente na superfície da cama para queima dos resíduos de penas (Figura 4C).
7. Ventilação do aviário por dois dias antes do alojamento do lote seguinte (Figura 4D).

Após completar este procedimento, os pintinhos de um dia foram alojados diretamente sobre a cama reutilizada.



**Figura 4.** Processo de fermentação da cama. **A.** Aviário após o carregamento das aves. Penas e crostas são vistas na cama. Comedouros e bebedouros são limpos e suspensos. **B.** A superfície da cama é coberta por lona plástica preta por sete dias. **C.** Após a remoção da lona, as crostas são retiradas, penas são queimadas com o lança chamas e a cama é mexida. Ventilação é realizada por dois dias. **D.** A cama está pronto para receber o novo lote.

### **Coleta de amostra**

A coleta da cama foi realizada quando as aves estavam entre 28 e 32 dias de idade. Botas plásticas com suabes pro-pé foram utilizados para as coletas. A coleta foi realizada após as mãos serem cuidadosamente lavadas. As pessoas que coletaram as amostras caminharam por cerca de 10 minutos ao longo dos comedouros e bebedouros buscando áreas com alta concentração de animais e portanto maior quantidade de excremento. A superfície do suabe pro-pé foi impregnada com material da cama. Os suabes pro-pé foram colocados dentro de sacos estéreis contendo 1% de solução de água peptonada e estocada em caixas de isopor com gelo. Os sacos com as amostras foram enviados para o laboratório após a coleta.

### **Análise laboratorial**

Os suabes pro-pés foram descataados e duas alíquotas da solução foram transferidas para meio de enriquecimento seletivo:  $0,5 \pm 0,05$  mL em 10 mL de meio Tetrationato e  $0,1 \pm 0,02$  mL em 10 mL de meio Rappaport-Vassiliadis. Ambos foram incubados separadamente a  $35 \pm 2$  °C e  $42 \pm 2$  °C por 18 h e 24 h, respectivamente, e foram cuidadosamente homogeneizados por agitação no vortex. Então, cada cultura foi estriada tanto em placas com ágar Verde Brilhante como em ágar MacConkey utilizando 10 µL de inóculo para cada. Placas com ágar foram incubadas durante 24 horas a  $35 \pm 2$  °C e examinadas para presença de colônias típicas de *Salmonella* spp. (BRASIL, 1995).

### **Análise Estatística**

O teste de qui-quadrado foi utilizado para verificar se existiam diferenças significativas na frequência da positividade ao longo da reutilização das camas. O critério para análise estatística foi  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

A detecção de *Salmonella* spp. em cama reutilizada ao longo de sete lotes está demonstrada na Tabela 11. Redução nas amostras positivas foi observada quando comparada com cama nova em todas as frequências de camas reutilizadas e fermentadas, demonstrando diferença significativa entre a cama do primeiro lote e dos lotes seguintes.

**Tabela 11.** Número de amostras positivas e negativas para *Salmonella* em camas novas e reutilizadas.

Número de criada da cama	1	2	3	4	5	6	7	Total
Positivo <i>Salmonella</i>	43 <sup>a</sup>	19 <sup>b</sup>	28	28	22	20	11	171
Negativo <i>Salmonella</i>	164	177	133	163	190	166	116	1109
Total	207	196	161	191	212	186	127	1280

<sup>a, b</sup> Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas no Qui-quadrado ( $p < 0.05$ ).

Além da redução na positividade por *Salmonella*, foi observada uma notável diminuição da infestação de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) nas camas fermentadas com lona estendida. Embora não foi feita nenhuma medição objetiva, consideramos esta observação pertinente para futuros estudos, pois a fermentação com lona estendida pode também contribuir para eliminação da maioria dos insetos e larvas sem o uso de produtos químicos.

## DISCUSSÃO

As propriedades incluídas neste estudo usaram a fermentação com lona estendida entre os lotes como uma estratégia para o manejo da cama. A concentração de amônia aumenta durante a digestão anaeróbia decorrente do processo de fermentação da cama. Este aumento na concentração de amônia leva a um efeito antimicrobiano em diferentes populações, inclusive na *Salmonella* spp. Estes resultados estão em concordância com Roll et al. (2011) que analisaram a



presença de *Salmonella* em camas reutilizadas por 14 lotes consecutivos e observaram redução na presença da *Salmonella* após o tratamento com cal.

O processo de tratamento da cama consiste na hidrólise de componentes complexos, incluindo gorduras, proteínas e polissacarídeos que são quebrados por microorganismos em suas subunidades com posterior produção de biogases coletáveis, principalmente metano e CO<sub>2</sub> (Kelleher et al., 2002; Chen et al., 2008). O resíduo dos aviários é composto por cama, excremento das aves e outros compostos. Devido ao alto metabolismo de proteína e aminoácido, os excrementos do frango de corte são ricos em nitrogênio orgânico na forma de ureia, que é na sua maioria convertida em amônia pela atividade microbiana decorrente do processo de nitrificação (conversão do nitrato) (Kelleher et al., 2002). Nesta rota metabólica a amônia apresenta-se como um gás (NH<sub>3</sub>) ou como amoníaco (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), que é hidrofóbico, solúvel em água e altamente permeável em membranas biológicas.

Amônia é considerada um inibidor da digestão anaeróbia pela diminuição da força motriz prótônica ou pela interferência no ciclo do ácido tricarboxílico. O primeiro requer tanto um pH e gradiente de elétrons, já o segundo envolve a aminação de  $\alpha$ -cetoglutarato, um intermediário necessário para o metabolismo de compostos orgânicos (Krylova et al., 1997; Chen et al., 2008).

Fatores adicionais abióticos deveriam ser considerados com por exemplo a temperatura alcançada durante a fermentação que também pode ter papel microbicida. A temperatura máxima da cama durante o processo de fermentação neste estudo foi de 60 °C (dados não registrados). Kim et al. (2012) observaram que a redução de *Salmonella* pode ser alcançada por exposição a cama fresca de aves a 70 °C por 80.5 a 100.8 min. Wilkinson et al. (2011) reportaram que *Salmonella* Typhimurium em cama fresca de aves foi completamente eliminada em 1 h de 55 °C

a 65 °C sob condições laboratoriais. Outros parâmetros abióticos que regulam as condições microbiológicas da cama são o pH (Payne et al., 2007) e a umidade (Eriksson et al., 2001). Os diferentes manejos e métodos de tratamento da cama podem modificar estes fatores (Torok et al., 2009; Miles et al., 2011).

Os microrganismos são responsáveis pela maioria das transformações bioquímicas na cama. Usando uma combinação de métodos de detecção por cultura e por biologia molecular no intestino de aves, Lu et al. (2003a) reportou que bactérias Gram-positivas foram as populações predominantes (incluindo *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* and *Streptococcus*) envolvidas na decomposição de material orgânico, inclusive a madeira. Neste estudo não foram encontrados microrganismos considerados patogênicos ao homem ou aos animais. Nosso estudo foi conduzido no Centro-oeste do Brasil. A composição da microbiota da cama depende da região geográfica (Cressman et al., 2010) e das condições ambientais (Dumas et al., 2011). Isso tem sido reportado na maioria dos estudos conduzidos na América do Norte e explica a diferença entre as duas situações analisadas.

Tem sido demonstrado que a diversidade na população de bactérias intestinais aumenta de acordo com a idade da ave (Lu et al., 2003b). A deposição de excrementos na cama altera rapidamente o ambiente biótico e abiótico onde simultaneamente as condições da cama afetam a microbiota intestinal (Chapman e Rayavarapu, 2007; Lee et al., 2011). Isso suporta nossa hipótese que a reutilização da cama baseada em procedimentos de uso racional pode melhorar a composição da microbiota intestinal favorecendo a saúde das aves.

Como conclusão deste estudo, a reutilização da cama fermentada demonstrou apresentar menor percentual em relação a presença da *Salmonella*

spp., comparativamente a cama nova. Estudos futuros são necessários para avaliar o efeito da reutilização da cama na presença de outros patógenos relevantes como *Clostridium* e *Eimeria*, bem como seu efeito em outros parâmetros físico-químicos da cama, custo de produção e impacto nos recursos naturais.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Portaria nº8 de 23 de janeiro de 1995. Método Analítico de Carcaças de Aves e Pesquisa de *Salmonella*. Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, 1995.

COOK, A.; ODUMERU, J.; LEE, S.; POLLARI, F. *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, verotoxigenic *Escherichia coli*, and *Escherichia coli* prevalence, enumeration, and subtypes on retail chicken breasts with and without skin. **Journal Food Protection**, v. 75, p. 34-40, 2012.

CRESSMAN, M.D.; YU, Z.; NELSON, M.C.; MOELLER, S.J.; LILBURN, M.S.; ZERBY, H.N. Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, p. 6572-6582, 2010.

CHAPMAN, H.D.; RAYAVARAPU, S. Acquisition of immunity to *Eimeria maxima* in newly hatched chickens reared on new or reused litter. **Avian Pathology**, v. 36, p. 319-323, 2007.

CHEN, Y.; CHENG J.; CREAMER, K. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4044-4064, 2008.

DUMAS, M.D.; POLSON, S.W.; RITTER, D.; RAVEL, J.; GELB, J.JR.; MORGAN, R.; WOMMACK, K.E. Impacts of poultry house environment on poultry litter bacterial community composition. **PLoS One**, v. 6, p. 1-12, 2011.

ERIKSSON, D.E.; REZENDE, C.L.; MALLINSON, E.T.; GUPTE, A.; JOSEPH, S.W. *Salmonella* spp. are affected by different levels of water activity in closed microcosms. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 26, p. 222-225, 2001.

FRIES, R.; AKCAN, M.; BANDICK, N.; KOBE, A. Microflora of two different types of poultry litter. **British Poultry Science**, v. 46, p. 668-672, 2005.

HAAPAPURO, E.R.; BARNARD, N.D.; SIMON, M. Review--animal waste used as livestock feed: dangers to human health. **Preventive Medicine**, v. 26, p. 599-602, 1997.

KELLEHER, B.P.; LEAHY, J.J.; HENIHAN, A.M.; O'DWYER, T.F.; SUTTON, D.; LEAHY, M.J. Advances in poultry litter disposal technology - a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 27-36, 2002.

KIM, J.; DIAO, J.; SHEPHERD, M.W.JR.; SINGH, R.; HERINGA, S.D.; GONG, C.; JIANG, X. Validating thermal inactivation of *Salmonella* spp. in fresh and aged chicken litter. **Applied Environmental Microbiology**, v. 78, p. 302-1307, 2012.

KRYLOVA, N.I.; KHABIBOULLINE, R.E.; NAUMOVA, R.P.; NAGEL, M.A. The influence of ammonium and methods for removal during the anaerobic treatment of poultry manure. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 70, p.99-105, 1997.

LARRISON, E.L.; BYRD, J.A.; DAVIS, M.A. Effects of litter amendments on broiler growth characteristics and *Salmonella* colonization in the crop and cecum. **Journal of Applied Poultry Research**, v.19, p. 132-136, 2010.

LEE, K.W.; LILLEHOJ, H.S.; LEE, S.H.; JANG, S.I.; RITTER, G.D.; BATISTA, D.A.; LILLEHOJ, E.P. Impact of fresh or used litter on the posthatch immune system of commercial broilers. **Avian Diseases**, v. 55, p. 539-544, 2011.

LOVANH, N.; COOK, K.L.; ROTHROCK, M.J.; MILES, D.M.; SISTANI, K. Spatial shifts in microbial population structure within poultry litter associated with physicochemical properties. **Poultry Science**, v.86, p. 1840-1849, 2007.

LU, J.; SANCHEZ, S. HOFACRE, C. MAURER, J.J.; HARMON, B.G.; LEE, M.D. Evaluation of broiler litter with reference to the microbial composition as assessed by using 16S rRNA and functional gene markers. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 901-908, 2003a.

LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J.J.; LEE, M.D. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6816-6824, 2003b.

MACKLIN, K.S.; HESS, J.B.; BILGILI, S.F.; NORTON, R.A. Effects of In-House Composting of Litter on Bacterial Levels. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 15, p. 531-537, 2006.

MILES, D.M.; ROWE, D.E.; CATHCART, T.C. High litter moisture content suppresses litter ammonia volatilization. **Poultry Science**, v. 90, p. 1397-1405, 2011.

PANDEY, P.K.; SOUPIR, M.L. *Escherichia coli* inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. **Applied and Industrial Microbiology and Biology Express**, v. 1, p. 18, 2011.

PAYNE, J.B.; OSBORNE, J.A.; JENKINS, P.K.; SHELDON, B.W. Modeling the Growth and Death Kinetics of *Salmonella* in Poultry Litter as a Function of pH and Water Activity. **Poultry Science**, v. 86, p. 191-201, 2007.

POPE, M.J.; CHERRY, T.E. An evaluation of the presence of pathogens on broilers raised on poultry litter treatment-treated litter. **Poultry Science**, v. 79, p. 1351-1355, 2000.

POTE, D.H.; WAY, T.R.; KLEINMAN, P.J.; MOORE, P.A.JR.; MEISINGER, J.J.; SISTANI, K.R.; SAPORITO, L.S.; ALLEN, A.L.; FEYEREISEN, G.W. Subsurface application of poultry litter in pasture and no-till soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 40, p. 402-411, 2011.

ROLL, V.F.; DAI PRA, M.A.; ROLL, A.P. Research on *Salmonella* in broiler litter reused for up to 14 consecutive flocks. **Poultry Science**, v. 90, p. 2257-2262, 2011.

TOROK, V.A.; HUGHES, R.J.; OPHEL-KELLER, K.; ALI, M.; MACALPINE, R. Influence of different litter materials on cecal microbiota colonization in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 88, p. 2474-2481, 2009.

VIZZIER THAXTON, Y.; BALZLI, C.L.; TANKSON, J.D. Relationship of Broiler Flock Numbers to Litter Microflora. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, p. 81-84, 2003.

VOLKOVA, V.V.; BAILEY, R.H.; WILLS, R.W. *Salmonella* in broiler litter and properties of soil at farm location. **PLoS One**, v. 4, p. 6403, 2009.

WATTS, D.B.; WAY, T.R.; TORBERT, H.A. Subsurface application of poultry litter and its influence on nutrient losses in runoff water from permanent pastures. **Journal of Environmental Quality**, v. 40, p. 421-430, 2011.

WILKINSON, K.G.; TEE, E.; TOMKINS, R.B.; HEPWORTH, G.; PREMIER, R. Effect of heating and aging of poultry litter on the persistence of enteric bacteria. **Poultry Science**, v. 90, p. 10-18, 2011.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle das salmoneloses continuará sendo um desafio para os profissionais que trabalham na Avicultura, principalmente em função da crescente exigência do mercado por um alimento seguro. Além disso, a complexa epidemiologia da *Salmonella* nos obriga a pensar nesta doença de forma ampla onde o agente etiológico, o hospedeiro e o ambiente estão em contínua interação.

A avicultura é um dos setores que mais tem aplicado o uso dos probióticos. Os benefícios práticos do seu uso racional se evidenciam por meio de ganhos nos índices zootécnicos e na redução da colonização intestinal por patógenos. Assim, consegue-se produzir animais saudáveis que reverterem em ganho no desempenho e levam a oferta de produtos de origem animal com maior segurança ao consumidor.

Porém, quando pensamos em controle da *Salmonella*, não existe ferramenta mágica para o problema. Os probióticos serão úteis como parte de um controle integrado que leve em consideração o sorovar e a situação de campo presente no momento.

Os sistemas intensivos de produção, onde eventualmente as aves são criadas em alta densidade populacional, com baixo intervalo e com reutilização da cama tem favorecido a permanência de agentes patogênicos no ambiente, entre eles a *Salmonella*. Assim, a cama e sua microbiota é um assunto de alta relevância dentro da sanidade das aves e merece atenção por parte da comunidade científica.

A cama reutilizada é uma complexa mistura de substrato, excreta de aves, ração não digerida, penas e pode conter mais que  $10^9$  bactérias aeróbicas/g, predominantemente bactérias Gram-positivas. Muitos fatores físico-químicos podem

influenciar a viabilidade e a reprodução das bactérias na cama. Estes fatores podem ser modificados por diferentes métodos de manejo e tratamento da cama.

Um tratamento adequado em camas reutilizadas demonstrou ser um processo válido para o auxílio do controle da *Salmonella*. Outros estudos precisam ser conduzidos para melhor entendimento da relação entre a microbiota da cama com a persistência da *Salmonella*. A pesquisa da microbiota da cama e sua relação com a ave é um campo a ser explorado e parece ser uma linha promissora para contribuir com formas de controle da *Salmonella* no ambiente.

A diversidade dos sorovares de *Salmonella* encontrados na natureza pode ser considerada mais um componente na dificuldade do controle desta doença. Os distintos comportamentos destes sorovares estudados indicam mais uma vez que não existem soluções únicas para todas as situações enfrentadas no campo.

A resposta imune do intestino em aves desafiadas com os diferentes sorovares demonstram que o agente etiológico está continuamente evoluindo e buscando formas de adaptar-se de modo a garantir sua sobrevivência. Ora como um microrganismo mais patogênico, ora como um microrganismo mais adaptado a ave.

A relação entre imunidade e o desempenho é um assunto de grande importância que envolve várias áreas do conhecimento (nutrição, fisiologia e imunologia). No caso das salmoneloses, as diferenças na resposta imune do intestino tem um impacto distinto na performance das aves, pois o custo de uma resposta imune é maior quando o sorovar é mais agressivo.

No futuro sugerem-se pesquisas que continuem a investigação dos três fatores relacionados às salmoneloses nas aves. Toda pesquisa que for realizada com vistas a esclarecer a relação entre agente etiológico, hospedeiro e ambiente

será de grande valor para os profissionais que trabalham com o desafio de controlar este patógeno na cadeia de produção.

### **VITA (Eduardo Correa Muniz)**

#### Histórico Profissional

Atualmente ocupa a posição de Gerente Técnico de Avicultura do Brasil na empresa Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda. Desde janeiro de 2013 até o momento.

Anteriormente trabalhou por 15 anos na Seara Alimentos (empresa controlada por Hering/Ceval, Bunge, Cargill e Marfrig group), sendo que de março/1997 a agosto/2005 atuou como veterinário de campo e de agosto/2005 até dezembro/2013 trabalhou como coordenador corporativo de sanidade avícola.

#### Histórico Acadêmico

Mestrado (*Stricto Sensu*) em Ciência Animal – Sanidade Animal – Patologia Veterinária

UFMS / “Universidade Federal do Mato Grosso do Sul” – Campo Grande – concluído em Março/2006

Especialização (*Lato Sensu*) em Administração Rural - UCDB

UCDB / “Universidade Católica Dom Bosco” – Campo Grande – concluída em Dezembro/2000



Graduação em Medicina Veterinária

UNESP – “Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho” – Campus de Jaboticabal – graduado em Dezembro/1996

Atividades realizadas durante o curso de pós-graduação:

Aprovado no Teste de Suficiência na 3ª Língua Estrangeira: Espanhol

Envio de resumos para o XXII Congresso Latino Americano de Avicultura, nota COALA nº4928/11, 4742/11 e 4927/11

Participação no projeto: “Produtos adicionados na ração para controle de *Salmonella* Minnesota SM em frangos de corte”.

Participação no Seminário Internacional de Salmoneloses Aviárias Rio de Janeiro, 28 a 30 de junho de 2011

Palestra Atualidades no Controle de Salmoneloses Aviárias na disciplina de Epidemiologia e Controle de Doenças Aviárias Emergentes do curso de pós-graduação em Saúde animal, UFPR, Curitiba, setembro de 2011

Participação no I Simpósio de Patologia e Produção Avícola da UFRGS, CDPA, Porto Alegre, 17 e 18 de novembro de 2011

Palestra Atualidades no estudo das Salmoneloses Aviárias, Simpósio Brasil Sul de Avicultura, Chapecó, SC, 17 de abril de 2012

Palestra Controle de Salmoneloses através de aditivos alimentares, Semana Acadêmica da Medicina Veterinária, UFPR, 09 de maio de 2012

Palestra Saúde Intestinal na Avicultura, LEPNAN, Curitiba, UFPR, 14 de junho de 2012

Qualificação do Doutorado em 01 de outubro de 2012 sendo a banca composta dos Profs. Doutores Elizabeth Santin, Alex Maiorka, Luiz Felipe Caron, Fabiano Montiani Ferreira e do Dr. Mário Sérgio Assayag Junior. Aprovado pela banca examinadora.

Participação do Seminary of Respiratory Diseases, Deventer, Holand, 17 a 21 de novembro de 2012

Participação do Master Intestinal Health com o tema Imunidade do trato gastrointestinal ministrado pelo Prof. Luiz Felipe Caron de 28 a 29 de novembro de 2012

Participação no AVMA Annual Convention in Chicago IL (AAAP) July 19 – 23, 2013.

Participação nos Seminários de Gestão Agropecuária BRF como palestrante sobre Biossegurança na cadeia agropecuária em sete eventos onde estiveram presentes 3.400 produtores integrados da regional RS no mês de agosto de 2013.

Participação no XXI Curso de Sanidade Avícola 2013 da Zoetis como palestrante sobre Biossegurança na Avicultura realizado em Jaguariúna/SP em 2013.

Participação no 2º Encontro Técnico Globoaves como palestrante do tema Controle e Prevenção das Salmoneloses Aviárias realizado em Cascavel/PR no dia 26 de setembro de 2013.

Participação no curso FACTA Impacto da *Salmonella* na Avicultura, como palestrante do tema “Vacinas contra *Salmonella* disponíveis no mercado brasileiro, portfólio Zoetis”, realizado em Campinas/SP nos dias 27 e 28 de novembro de 2013.

Conclusão dos créditos em disciplinas necessárias como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná.

Artigos publicados em periódicos científicos como primeiro autor:

MUNIZ, E.C.; PICKLER, L.; LOURENÇO, M.C.; WESTPHAL, P.; KURITZA, L.N.; SANTIN, E. Probióticos na ração para o controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.18, n.3, p.52-60, 2013.

MUNIZ, E.C.; MESA, D.; CUASPA, R.; SOUZA, A.; SANTIN, E. Presence of *Salmonella* spp. in reused broiler litter. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 27, p.12-17, 2014.

Artigo a ser submetido a periódico científico:

O artigo intitulado: “Resposta imunológica da mucosa intestinal de frangos de corte desafiados com diferentes sorovares de *Salmonella*” como primeiro autor a ser submetido para a Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Participação em resumos publicados em anais de eventos

MUNIZ, E.C.; KURITZA, L.N.; PICKLER, L.; MIGLINO, L.B.; WESTPHAL, P.; LOURENÇO, M.C.; TOLEDO, M.; GIURIATTI, J.; SANTIN, E. Associação de ácidos orgânicos, *Bacillus subtilis* e mananoligossacarídeos no controle da *Salmonella* Minnesota em Frangos de Corte. In: XXII Congresso Latino Americano de Avicultura 2011. Anais..., Buenos Aires, 2011.

WESTPHAL, P.; MUNIZ, E.C.; MIGLINO, L.B.; KURITZA, L.N.; LOURENÇO, M.C.; KRAIESKI, A.L.; SANTIN, E. Utilização de produto probiótico à base de *Lactobacillus* adicionado na água para o controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. In: XXII Congresso Latino Americano de Avicultura 2011. Anais..., Buenos Aires, 2011.

KURITZA, L.N.; PICKLER, L.; MIGLINO, L.B.; WESTPHAL, P.; LOURENÇO, M.C.; TOLEDO, M.; MUNIZ, E.C.; SANTIN, E. Probióticos à base de *Enterococcus Faecium* NCIMB 10415 no controle da *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. In: XXII Congresso Latino Americano de Avicultura 2011. Anais..., Buenos Aires, 2011.

GIURIATTI, J.; AIRES, D.N.; LAGO, A.L.; ZANAO, A.; MUNIZ, E.C.; SANTIN, E. Inoculação experimental de *Salmonella* Minnesota em Frangos de Corte. 63ª Reunião Anual da SBPC, 10 a 15 de julho, Universidade Federal de Goiás/GO, 2011.

PICKLER, L.; LOURENÇO, M.; MIGLINO, L.; MUNIZ, E.; KRAIESKI, A.; SANTIN, E. The effect of *Bacillus subtilis* on mucosa immune response of broilers challenged with *Salmonella* Minnesota. In: International Poultry Scientific Forum 2012. P208. Abstract Book..., Atlanta, 2012.

PICKLER, L.; LOURENÇO, M.; MIGLINO, L.; KURITZA, L.; WESTPHAL, P.; MUNIZ, E.; SANTIN, E. *Bacillus subtilis* significantly reduces *Salmonella* Minnesota in broilers and in the surrounding environment. In: International Poultry Scientific Forum 2012. P209. Abstract Book..., Atlanta, 2012.

LOURENCO, M.C.; KURITZA, L.N.; WESTPHAL, P.; MUNIZ, E.; PICKLER, L.; SANTIN, E. Effects of *Bacillus subtilis* in the Dynamics of Infiltration of Immunological Cells in the Intestinal Mucosa of Chickens Challenged with *Salmonella* Minnesota. **International Journal of Poultry Science**, v. 11, n. 10, p. 630-634, 2012.

## ANEXO 1

Archives of Veterinary Science  
v.18, n.3, p.52-60, 2013

ISSN 1517-784X  
www.ser.ufpr.br/veterinary

## PROBIÓTICOS NA RAÇÃO PARA O CONTROLE DE *SALMONELLA* MINNESOTA EM FRANGOS DE CORTE

Eduardo Correa Muniz<sup>1</sup>, Larissa Pickler<sup>1</sup>, Mariana Camargo Lourenço<sup>1</sup>, Patrick Westphal<sup>1</sup>, Leandro Nagae Kuritza<sup>1</sup>, Elizabeth Santin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UFPR

Correspondência: Eduardo Correa Muniz: eduardo.muniz@ufpr.br

**RESUMO:** Foi delineado o presente estudo com o objetivo de comparar a capacidade de diferentes probióticos via ração, em reduzir a colonização de *Salmonella* e interferir com a dinâmica celular na mucosa intestinal em frangos desafiados com *Salmonella enterica enterica* sorovar Minnesota (SM). Foram utilizados probiótico A constituído de *Bacillus subtilis* CCT 7711, probiótico B contendo *Lactobacillus acidophilus* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus bulgaricus* + *Enterococcus faecium* + *Streptococcus thermophilus* + *Bifidobacterium bifidum*, probiótico C constituído de *Bacillus subtilis* DSM 5750 e probiótico D *Enterococcus faecium*. Foi observado que todos os probióticos testados foram capazes de reduzir significativamente a contagem de *Salmonella* em swabs de cloaca, 48h após inoculação, com relação ao controle positivo. Todos os probióticos foram capazes de reduzir a contagem de *Salmonella* em ceco comparados ao controle positivo aos 35 dias. Os probióticos testados não foram capazes de reduzir a contagem de *Salmonella* em papo aos 35 dias de idade das aves. Na mucosa do ceco das aves, verificou-se que todos os probióticos aumentaram as células CD4+ e CD8+ em relação ao grupo controle negativo aos 7 dias de vida; apenas os probióticos C e D reduziram significativamente os níveis de células CD8+ na mucosa cecal de frangos aos 35 dias, em relação ao grupo controle positivo. Com base nos resultados do presente estudo, verificou-se que os probióticos, utilizados neste estudo, tiveram diferentes efeitos sobre a redução na presença de SM e também afetaram de forma diferente a dinâmica celular da mucosa cecal das aves.

**Palavras-chave:** células caliciformes; células CD4+; células CD8+; probióticos

## PROBIOTICS IN DIET TO CONTROL *SALMONELLA* MINNESOTA IN BROILERS

**ABSTRACT:** The present study was designed to compare the ability of different probiotics, applied in feed, to reduce *Salmonella* colonization and interfere with the cellular dynamics in the intestinal mucosa of broilers challenged with *Salmonella enterica enterica* sorovar Minnesota (SM). The following probiotics were used: A composed of *Bacillus subtilis* CCT 7711; B containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus*, and *Bifidobacterium bifidum*; C consisting of *Bacillus subtilis* DSM 5750; and D with *Enterococcus faecium*. All tested probiotics were able to significantly reduce the *Salmonella* counts in cloacal swabs assessed at 48 h after inoculation when compared with the positive control. All probiotics were able to reduce the *Salmonella* counts in the cecum when compared to the positive control at 35 days. None of the tested probiotics reduced the *Salmonella* counts in the crop of broilers at 35 days of age. All probiotics induced an increase in the CD4+ and CD8+ cell counts in the cecum mucosa relative to the negative control group at 7 days of age; only probiotics C and D, reduced significantly the CD8+ cell counts in this same tissue of broilers at 35 days compared to positive control group. The results from this study indicated that the tested probiotics presented different effects on the reduction of SM counts and affected the cell dynamics in the cecum mucosa of broilers differently.

**Key Words:** goblet cells; CD4+ cells; CD8+ cells; *Salmonella* Minnesota; probiotics

Recebido em 10/11/2012  
Aprovado em 25/06/2013

## INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças transmitidas por alimentos, em especial as salmoneloses, são motivo de preocupação para a indústria avícola, pois bactérias deste gênero tem sido identificadas como uma das principais causas de surtos alimentares em seres humanos. Esses microrganismos podem causar desde infecções alimentares brandas até casos fatais e seu comportamento pode variar muito de acordo com o sorovar envolvido. A espécie *Salmonella enterica* subespécie *enterica* possui mais de 2000 sorovares descritos, cuja prevalência pode variar entre localidades, estados, e países, sendo recomendado estabelecer medidas de vigilância e identificação destes sorovares em seres humanos e aves de produção, com o propósito de desenvolver programas de controle nesta área (OIE, 2011).

A *Salmonella* Minnesota (SM) foi isolada pela primeira vez, em 1936, em um peru de três semanas de idade de uma granja no estado de Minnesota nos EUA (Edwards e Bruner, 1938). Naquele país, entre 1996 e 2006 foram diagnosticados 340 casos de SM em casos de toxinfecção em seres humanos (Centers of Disease Control, 2008).

No último relatório anual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasileira (Anvisa, 2007), SM esteve envolvida em 1,2% dos casos de salmoneloses, sendo que a *Salmonella* Enteritidis representou o principal sorovar isolado com 48,8%. A SM também apareceu no sistema de alerta rápido da Europa, em carne de frango exportada do Brasil para a Holanda, no ano de 2008 (Rasff, 2008). Este sistema de comunicação destaca a importância da salmonelose, como barreira ao comércio internacional de alimentos.

Em trabalho de tipificação de *Salmonella*, em amostras positivas de

frangos de corte, realizadas pelo Ministério da Agricultura do Brasil, percebeu-se elevação do percentual de SM encontrado entre o período de 2009/2010 que foi de 9,38% comparado ao período anterior, 2004/2008, onde a positividade para SM foi de 0,96% (Freitas, 2011). Este aumento da SM foi observado, principalmente, em aves criadas na região Centro-Oeste do país mostrando que o comportamento dos diferentes sorovares tem relação com características regionais.

Um dos fatos que dificultam o controle deste microrganismo em plantéis avícolas refere-se à falta de sinais clínicos e/ou lesões, pois na maioria das vezes, a ave é portadora assintomática. Além disso, estudos epidemiológicos ao longo do tempo mostram que existe relação de exclusão competitiva entre diferentes sorovares. Este comportamento de alternância entre sorovares distintos indica que o nicho ecológico de um sorovar específico pode ser ocupado por outro sendo que o controle de um sorovar pode interferir na prevalência de outros (Rabsch et al., 2000).

Por todos estes aspectos, as empresas avícolas empregam um programa de biossegurança que envolve o uso de vacinas, desinfetantes, probióticos, prebióticos e ácidos orgânicos no sentido de se controlar a Salmonelose.

Os probióticos, em especial, são produtos compostos de microrganismos vivos com capacidade de se instalar e proliferar no trato intestinal beneficiando o hospedeiro através do equilíbrio da microbiota natural e que já foram descritos como capazes de controlar *Salmonella* (Reid e Friendship, 2002; Dahiya et al., 2006). Os mecanismos de ação descritos para explicar o funcionamento dos probióticos são: competição por sítios de ligação (Jin et al., 1997), produção de substâncias antimicrobianas (Tagg et al., 1976;

Lewenstein *et al.*, 1979; Lauková *et al.*, 2004), competição por nutrientes e estímulo ao sistema imunológico (Fuller e Gibson, 1997; Noujaim *et al.*, 2008; Mouni *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010).

No entanto, ainda existem muitas dúvidas sobre o mecanismo da ação de probióticos em função da grande diversidade de composição dos produtos disponíveis comercialmente, e também da interação específica entre esta microbiota e mucosa intestinal das aves.

O objetivo do presente estudo foi comparar a capacidade de diferentes probióticos comerciais na redução da excreção de *Salmonella*, em aves desafiadas com *Salmonella enterica enterica* sorovar Minnesota (SM). Além disso, foi investigado o efeito dos diferentes probióticos sobre a dinâmica de células imunológicas na mucosa intestinal de aves.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram alojados 120 frangos de corte do 1º ao 35º dia de idade, divididos em delineamento inteiramente casualizado com 6 tratamentos de acordo com o Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos.

Tratamento	Probiótico	Composição	Células/via Região
T1	Controle	Ração Casei	-
T2	Antibiótico	Ração Casei	-
T3	Probiótico A	<i>Bacillus subtilis</i> (COT 111)	$4,5 \times 10^8$ UFC/g
T4	Probiótico B	<i>Enterococcus faecium</i> NCIM 50154, <i>Lactobacillus plantarum</i> NCIM 50155, <i>Lactobacillus reuteri</i> NCIM 50156, <i>Candida albicans</i> NCIM 50157, <i>Enterococcus faecium</i> NCIM 50158, <i>Streptococcus thermophilus</i> NCIM 50159, <i>Streptococcus salivarius</i> NCIM 50160	$3,2 \times 10^7$ UFC/g
T5	Probiótico C	<i>Bacillus subtilis</i> (DSM 1730)	$1,6 \times 10^7$ UFC/g
T6	Probiótico D	<i>Enterococcus faecium</i> (ATCC 29218)	$3,2 \times 10^8$ UFC/g

As aves de cada tratamento foram alojadas em sala, com pressão negativa, separadas, idênticas e localizadas lado a lado para evitar a contaminação entre os diferentes probióticos.

Estas salas foram previamente limpas, desinfetadas e a cama de maravalha utilizada foi previamente

esterilizada em autoclave 121°C/ 15 minutos. Foi realizado teste de esterilidade nas salas, equipamentos e cama antes do início do experimento. Na chegada dos animais foi realizado eutanásia e necropsia de 5 animais para coleta de fígado e ceco e realização de análise de presença/ausência de *Salmonella*.

Os animais foram mantidos em temperatura ideal de conforto para a idade das aves, com fornecimento de água e ração à vontade, sendo alimentadas com dietas peletizadas e balanceadas em níveis iguais ou superiores recomendados pelo NRC (1994).

Aos 15 dias de idade os animais dos tratamentos 2 ao 6 foram inoculados com 1 mL de suspensão de *Salmonella* Minnesota na concentração  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL por via oral.

Para o preparo do inóculo, uma colônia pura de SM, isolada de frangos de corte, foi retirada do Agar estoque e incubada em solução de BHI (Brain Heart Infusion) por 24h a 37°C. Esta suspensão foi diluída até a concentração 0,5 da Escala de MacFarland e aferida em espectrofotômetro, previamente descrito por Pickler *et al.* 2012.

Para análise microbiológica foram realizados suabes de cloaca 48h após inoculação, sendo 5 amostras por tratamento (cada amostra foi um pool de 3 animais) para análise de contagem de *Salmonella*. Aos 7 dias de idade (5 animais por tratamento) e aos 35 dias de idade (10 animais por tratamento) foram eutanasiados, por deslocamento cervical e necropsiados para coleta de papo e ceco de forma asséptica e posterior análise de *Salmonella*.

Foram realizadas também coletas de fragmentos de íleo e ceco de 5 animais por tratamento fixados em formol tamponado 10% para análise de células calciformes e fragmentos dos mesmos segmentos congelados em

nitrogênio líquido para posterior análise de linfócitos T CD4+ e CD8+ através de imunohistoquímica.

Para realização do procedimento de contagem de *Salmonella* procedeu-se como Pickler et al., 2012. Os suabes de cloaca, os papos e os cecos foram diluídos em água peptonada 2% em proporção de 1:9. Retirou-se 1 mL da solução de água peptonada 2% que foi pipetado no tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1% e assim sucessivamente até a diluição  $10^{-3}$ . Posteriormente retirou-se 100  $\mu$ L de cada diluição, plaqueou-se em duplicata em meio XLD (Xylose Lysine Desoxycholate) e com uma alça de Drigalsky estéril espalhou-se o líquido na placa. As placas foram incubadas em estufa regulada a 35°C por 24h e submetidas à posterior contagem das colônias típicas.

A solução inicial de água peptonada 2% foi incubada a 35°C por 24h, em caso de não ter ocorrido crescimento de colônias típicas de *Salmonella* sp. em plaqueamento direto, retirou-se 100  $\mu$ L da solução inicial em água peptonada 2% e acrescentou-se em um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, incubou-se em estufa regulada a 42°C por 24h para confirmação da positividade ou negatividade da amostra.

Os resultados das contagens de colônias foram expressos de acordo com Procedimentos de Contagem de Colônia de acordo com a Normativa nº62 publicada em 26 de agosto de 2003 (Brasil - MAPA).

Para as análises de linfócitos T CD4+ e CD8+ através de imunohistoquímica, as amostras foram incluídas em gel Tissue-Tek O. C. T. (Miles, Elkhart IN, US), congeladas em nitrogênio líquido, seccionadas com 5 $\mu$ m de espessura em um aparelho criostato e fixadas em lâminas carregadas positivamente em acetona 100%. Em seguida foi realizada a re-

hidratação com PBS 0,1M pH 7,6, bloqueio da peroxidase endôgena com peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos e proteína bloqueadora por 8 minutos. Os anticorpos primários utilizados foram Anti-CD4 (CT-4 Southern Biotech 1:100) e Anti-CD8 (CT-8 Southern Biotech 1:100), incubados por 90 minutos a 37°C. Para detecção da reação foi utilizado anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho combinados em sistema de amplificação, kit ADVANCE®, por 30 minutos. Para revelação da reação foi utilizado cromógeno, kit DAB®, por 30 segundos. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Meyer (adaptado de Jeurissen et al., 2000).

Campos microscópicos com presença de células positivas foram quantificados em microscopia de luz com ampliação de 100X (Olympus BX41 Olympus America INC., NY, USA). Foram analisados 20 campos para cada grupo experimental e para cada marcador de superfície celular.

As amostras de íleo ceco foram processadas rotineiramente para histologia e coradas com Alcian Blue. Foi avaliada a contagem de células caliciformes, com leitura de 20 campos por grupo experimental em um aumento de 100X (Olympus BX41 Olympus America INC., NY, USA) (Smimov et al., 2004).

Foi utilizado o programa estatístico StatView for Windows Copyright® 1998 (SAS Institute Inc., NC, USA). As contagens de colônias de *Salmonella* foram transformadas em Log 10 para análise estatística. Todos os resultados foram submetidos à ANOVA, teste de Fischer à 5% de probabilidade.

## RESULTADOS

As amostras de fígado e ceco coletadas no primeiro dia e os papos e cecos coletados aos 7 dias de idade



foram todas negativas para análise de *Salmonella* sp. O tratamento negativo não inoculado permaneceu negativo para SM na cama e órgãos durante todo o período indicando a eficiência do sistema de isolamento entre as câmaras que separavam os tratamentos.

Os resultados da contagem de colônias de *Salmonella* (média  $\pm$  desvio padrão) em suabe de cloaca 48h após inoculação, papo e ceco aos 35 dias de idade dos diferentes tratamentos estão expressos na Tabela 2. Todos os probióticos testados foram capazes de reduzir significativamente a contagem de *Salmonella* em suabes 48h após inoculação com relação ao controle positivo. Além disso, todos os probióticos foram capazes de reduzir a contagem de *Salmonella* em ceco aos 35 dias quando comparado ao controle positivo. Por outro lado, os probióticos testados não foram capazes de reduzir a contagem de *Salmonella* em papo aos 35 dias de idade das aves.

Tabela 2 - Média e desvio padrão da contagem de colônias de *Salmonella* em suabe cloaca 48h após inoculação, papo e ceco de frangos de corte aos 35 dias de idade nos diferentes tratamentos (Resultados expressos em Log10 UFC/g).

Tratamento	MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (N=10/REP. 10)		MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (N=10)		MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (N=10)	
	Coliformos	CD4+	Coliformos	CD4+	Coliformos	CD4+
Controle Negativo	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Controle Positivo	3,8 $\pm$ 2,2	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Probiótico A	1,0 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 1,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0
Probiótico B	1,0 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,7	0,7 $\pm$ 0,7	0,7 $\pm$ 0,7	0,7 $\pm$ 0,7	0,7 $\pm$ 0,7
Probiótico C	0,0 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,7	0,7 $\pm$ 0,7	0,7 $\pm$ 0,7	0,7 $\pm$ 0,7	0,7 $\pm$ 0,7
Probiótico D	1,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

Valores de P: 0,001 0,001 0,001

\* Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes para P<0,05

A Tabela 3 expressa os resultados da contagem de células caliciformes, células CD4+ e CD8+ na primeira coleta (7 dias de idade) em ileo e ceco de frangos de corte nos diferentes tratamentos.

Tabela 3 - Contagem (média e desvio padrão) de células caliciformes, CD4+ e CD8+ por campo em ileo e ceco de frangos de corte aos 7 dias de idade nos diferentes tratamentos (aumento de 100x).

Tratamento	Ileo			Ceco		
	Caliciformes	CD4+	CD8+	Caliciformes	CD4+	CD8+
C. Negativo	41 $\pm$ 0,4	41 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 1,3	10 $\pm$ 1,3	10 $\pm$ 1,3	10 $\pm$ 1,3
C. Positivo	—	—	—	—	—	—
Probiótico A	61 $\pm$ 0,4	61 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 1,3	10 $\pm$ 1,3	10 $\pm$ 1,3	10 $\pm$ 1,3
Probiótico B	41 $\pm$ 0,4	41 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 1,3	10 $\pm$ 1,3	10 $\pm$ 1,3	10 $\pm$ 1,3
Probiótico C	61 $\pm$ 0,4	61 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 1,3	10 $\pm$ 1,3	10 $\pm$ 1,3	10 $\pm$ 1,3
Probiótico D	61 $\pm$ 0,4	61 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 1,3	10 $\pm$ 1,3	10 $\pm$ 1,3	10 $\pm$ 1,3
Valor de P	<0,001	0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001

\* Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes para P<0,05

A Tabela 4 expressa os resultados da contagem de células caliciformes e células CD4+ e CD8+ na segunda coleta (35 dias de idade) no ileo e ceco de frangos de corte nos diferentes tratamentos.

Tabela 4 - Contagem (média e desvio padrão) de células caliciformes, CD4+ e CD8+ por campo em ileo e ceco de frangos de corte aos 35 dias de idade nos diferentes tratamentos (aumento de 100x).

Tratamento	Ileo			Ceco		
	Caliciformes	CD4+	CD8+	Caliciformes	CD4+	CD8+
C. Negativo	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4
C. Positivo	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4
Probiótico A	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4
Probiótico B	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4
Probiótico C	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4
Probiótico D	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 0,4
Valor de P	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

\* Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes para P<0,05

## DISCUSSÃO

Nurmi e Rantala (1973) foram pioneiros em descrever o uso do mecanismo chamado de exclusão competitiva (EC) no controle de *Salmonella*. Esses pesquisadores demonstraram que a colonização precoce com bactérias de aves adultas em aves jovens era capaz de proteger contra a colonização destas por *Salmonella*. Em princípio esse mecanismo foi associado à produção, por parte de microorganismos oferecidos às aves jovens, de ácidos voláteis que seriam capazes de inibir o crescimento de *Salmonella*. Posteriormente, Soerjadi et al. (1981) demonstraram que a proteção ao desafio oral por *Salmonella* iniciava aparentemente 1 a 2 horas após o tratamento com a microbiota protetora, o que indicaria que não somente a presença de ácidos orgânicos voláteis, mas também a competição por sítios de ligação poderia ser importante no mecanismo de inibição de *Salmonella*.

No que se refere ao controle de SM, foi verificado que todos os produtos utilizados foram efetivos em diminuir a excreção de SM em suabes de cloaca de aves 48h após a inoculação em relação ao grupo inoculado que não recebeu nenhum probiótico. Em relação

a porcentagem de redução de SM, aos 35 dias, em ceco das aves com relação ao controle positivo, foi de 76,04% no probiótico A, 46,27% no probiótico B, 62,09% no probiótico C e 73,45% no probiótico D.

O efeito inibitório de probióticos sobre a população de enterobactérias patogênicas por meio do mecanismo de exclusão competitiva é bastante documentado na literatura (Reid e Friendship, 2002; Dahiya et al., 2006), e pode ser uma possível explicação para efeito de redução de SM observado no presente estudo pelos diferentes probióticos.

Na análise da dinâmica celular na mucosa intestinal de aves frente aos diferentes probióticos, foi observado que todos aumentaram a quantidade de células caliciformes na mucosa de íleo e ceco das aves aos 7 dias de idade. As células caliciformes, presentes nas vilosidades intestinais são responsáveis pela manutenção da camada de muco que atua como meio de proteção físico e biológico e também é um componente da resposta imunológica inata que é regulada em resposta à inflamação e infecção (Uni et al., 2003), assim acredita-se que a presença dos probióticos na dieta das aves pode interferir na resposta imunológica inata representada pela expressão de células produtoras de muco.

A inclusão/exclusão imunológica está relacionada com a produção de IgA pelo hospedeiro que facilita ou dificulta a adesão de bactérias na mucosa intestinal. Quando o microrganismo é benéfico ocorre uma baixa produção de IgA, que se liga ao agente e facilita a adesão deste na mucosa intestinal formando um biofilme que protege contra infecção por outros microrganismos e evita a translocação dessas bactérias através da mucosa do hospedeiro (inclusão imunológica). Por outro lado, microrganismos que causam lesão, estimulam a produção de

altos níveis de IgA que inibem o agente e impedem a adesão deste ao hospedeiro (exclusão imunológica). (Everret et al., 2004).

O uso de probióticos na dieta também interferiu com a presença de células CD4+ e CD8+ na mucosa intestinal das aves. Segundo Van Immerseel et al. (2002), o encontro de células epiteliais especializadas com microrganismos, rapidamente estimula a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias que atraem células imunológicas inatas, como granulócitos e macrófagos, capazes de desencadear novas reações imunológicas, como o aparecimento de linfócitos T auxiliares (células CD4+).

As células CD4+ estão relacionadas ao início da resposta imunológica específica, sendo estas responsáveis também pela modulação imunológica. Essas células são chamadas de linfócitos T auxiliares e podem apresentar o antígeno para os Linfócitos B para a produção de anticorpos e também interferem com a imunidade celular (Fearon e Locksley, 1996). Linfócitos T citotóxicos (CD8+) estão diretamente relacionadas a eliminação de patógenos intracelulares sendo responsáveis pela imunidade celular (Zou et al., 2006).

No presente estudo, na mucosa do ceco das aves, que parece ser o sítio de maior atuação dos probióticos, verificou-se que todos aumentaram as células CD4+ em relação ao grupo controle negativo aos 7 dias de vida das aves. Quanto às células CD8+ foi verificado que os probióticos A e B aumentaram os níveis de células CD8+ na mucosa em relação ao grupo que não consumiu probióticos na dieta. Alguns autores (Noujaim et al., 2008; Mouni et al., 2009; Lee et al., 2010) citam que algumas bactérias como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium bifidum*, presentes no probiótico B podem atuar

estimulando o aumento de CD8+ específico.

Após o desafio com SM, foi observado que as aves que não consumiram os probióticos na dieta apresentaram aumento no número de células CD8+ na mucosa do ceco quando comparado ao grupo não desafiado. O mesmo ocorreu em aves desafiadas que foram alimentadas com A e B. Como estes produtos sozinhos foram capazes de aumentar a presença destas células na mucosa, verificado na análise de 7 dias de idade, não se pode dizer que este efeito deveu-se ao estímulo da SM sozinho (Dahiya *et al.*, 2006).

Por outro lado, foi verificada redução de células CD8+ na mucosa do ceco das aves alimentadas com os probióticos C e D em relação ao grupo controle desafiado, e isso pode ser associado a redução de bactérias patogênicas no lúmen intestinal como visto por seu efeito sobre a presença de SM no ceco de aves alimentadas por estes probióticos. Scharek *et al.* (2005) observaram que redução na contagem de células CD8+ em suínos pode ser associada a redução na contagem de *E. coli*. Em verdade, os probióticos C e D diminuíram as células CD8+ mas aumentaram as células CD4+ e isso também pode ter interferido na resposta a SM, pois sabe-se que as células CD4+ também podem atuar na resposta imunológica humoral, pois são elas que apresentam os antígenos para os linfócitos B se diferenciarem em células produtoras de anticorpos como IgA.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados do presente estudo, verificou-se que também ocorre interferência dos probióticos da dieta com respostas imunológicas na mucosa intestinal das aves. Estes resultados sugerem que o efeito dos probióticos utilizados neste

estudo sobre a redução na presença de SM pode ser resultado de uma associação de mecanismo de exclusão competitiva e imunomodulação. Entretanto foram verificadas diferenças na atuação de cada probiótico sobre presença de células imunológicas na mucosa intestinal de frangos, sendo necessários maiores estudos para se compreender esse efeito imunomodulatório dos probióticos.

É possível concluir com o presente estudo que diferentes probióticos apresentam diferentes capacidades de afetar a colonização de *Salmonella* em aves desafiadas e alteram a dinâmica celular da mucosa cecal das aves

## NOTAS INFORMATIVAS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA SCA) da Universidade Federal do Paraná sob Protocolo nº 34-2011.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Relatório anual 2007. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/Relatorio\\_GALI\\_2007.pdf](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/Relatorio_GALI_2007.pdf)> Acesso em: 16/08/2012.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Instrução Normativa nº62, publicada em 26 de agosto de 2003.
- CENTERS OF DISEASE CONTROL - CDC. *Salmonella Surveillance: Annual Summary*, 2006. Atlanta, Georgia: US Department of health and Human Services, 2008, 101p.
- DAHIYA, J.P.; WILKIE, D.C. ; VAN KESSEL, A.G. ; DREW, M.D. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Animal Feed Science and Technology*, v.129 n.1-2, p.60-88, 2006.
- EDWARDS, P.R.; BRUNER, D.W.. Two new *Salmonella* Isolated from Fowls. *Journal of Hygiene*, v.38, n.6, p.716-720, 1938.
- EVERETT, M.L.; PALESTRANT, D.; MILLER, S.E.. Immune exclusion and Immune inclusion: A new mode of host-bacterial Interactions in the

gut. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, v.4, p.321-332, 2004.

FEARON, D.T.; LOCKSLEY, R.M. The instructive role of Innate Immunity in the acquired Immune response. *Science*, v.272, p.50-54, 1996.

FREITAS, J. Evolução de sorovares Modelo de banco de cepas. In: Seminário Internacional de Salmoneloses Aviárias. 2011. Rio de Janeiro, RJ. Anais. Campinas:UBABEF, 2011, CD-ROM

FULLER, R.; GIBSON, G.R.. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v.32, supl.222, p.28-31, 1997.

JEURISSEN, A.H.M.; CLAASSEN, E.; BOONSTRA-BLOM, A.G. et al. Immunocytochemical techniques to investigate the pathogenesis of infectious micro-organisms and the concurrent immune response of the host. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v.24, p.141-151, 2000.

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S.. Probiotics In poultry: modes of action. *World's Poultry Science Journal*, v.53, p.351-68, 1997.

LAUKOVÁ, A.; GUBA, P.; NEMCOVÁ, R.; MAREKOVÁ, M. Inhibition of *Salmonella enterica* serovar Dösselndorf by enterocin A in gnotobiotic Japanese quails. *Veterinary Medicine Czech*, v.49, p.47-51, 2004.

LEE, K.; LILLEHOJ, H.S.; SIRAGUSA, G.R.. Direct-fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. *Journal of Poultry Science*, v.47, p.106-114, 2010.

LEWENSTEIN, A.; FRIGERIO, G.; MORONI, M.. Biological properties of sf68, a new approach for the treatment of diarrhoeal diseases. *Current Therapy Research*, v.26, p.967-981, 1979.

MOUNI, F.; AISSI, E.; HERNANDEZ, J. et al. Effect of *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 cytoplasmatic fraction on human immune cells. *Immunological Investigation*, v.38, n.1, p.104-15, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. *Nutrient requirements of poultry*. 9th rev. ed. National Academy Press: Washington, D.C, 1994.

NOUJAIM, J.C.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T. et al. Detection of T lymphocytes in intestine of broiler chicks treated with *Lactobacillus* spp. and challenged with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Poultry Science*, v.87, n.3, p.927-933, 2008.

NURMI, E. V.; RANTALA, M.. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature*, n.241, p.210, 1973.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES - OIE. *World Organisation for Animal Health*, 2011. *Terrestrial Animal Health Code*. 21<sup>st</sup> ed. 435 p. Disponível em: <<http://www.oie.int/doc/ged/D10905.PDF>>. Acesso em: 16/08/2012.

PICKLER, L.; HAYASHI, R.M.; LOURENÇO, M.C. et al. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella Enteritidis* e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.1, p.27-36, 2012.

RABSCH, W.; HARGIS, B.M.; TSOLIS, R.M. et al. Competitive Exclusion of *Salmonella Enteritidis* by *Salmonella Gallinarum* in poultry. *Emerging Infectious Diseases*, v.6, n.5, p.443-448, 2000.

RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED - RASFF. *The rapid alert system for food and feed*. Annual report, 2008. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2008\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2008_en.pdf)>. Acesso em: 16/08/2012.

REID, G.; FRIENDSHIP R. 2002. Alternative to antibiotic use: probiotics for the gut. *Animal Biotechnology*, v.13, n.1, p.97-112, 2002.

SCHAREK, L.; GUTH, J.; REITER, K. et al. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.105, p. 51-161, 2005.

SMIRNOV, A.; SKLAN, D.; UNI, Z.. Mucin dynamics in the chick small intestines are altered by starvation. *The Journal of Nutrition*, v.134, n.4, p.736-742, 2004.

SOERJADI, A.S.; STEHMAN, S.M.; SNOEYENBOS, G.H. et al. Some measurements of protection against paratyphoid *Salmonella* and *Escherichia coli* by competitive exclusion in chickens. *Avian Diseases*, v.24, p.706-712, 1981.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W.. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, v.40, n.3, p.722-56, 1976.

UNI, Z.; SMIRNOV, A.; SKLAN, D.. Pre- and Post hatch development of goblet cells in the broiler small intestine: effect of delayed access to feed. *Poultry Science*, v.82, n.2, p.320-327, 2003.

VAN IMMERSEEL, F.; BUCK, J.; SMET, I. et al. The effect of vaccination with a *Salmonella*

enteritidis aroA mutant on early cellular responses in caecal lamina propria of newly-hatched chickens. *Vaccine*, v.20, p.3034–3041, 2002.

ZOU, F.C.; JIANG, Y.P.; NIE, K. et al. Dynamic changes of CD4+ and CD8 T lymphocyte subpopulations in blood of chicks infected with *Eimeria tenella*. *Poultry Husbandry Diseases Control*, v.10, n.1, p.4–7, 2006.

## ANEXO 2

12

rccp

Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias

Presence of *Salmonella* spp. in reused broiler litter<sup>a</sup>*Presencia de Salmonella spp. en cama reutilizada de pollos de engorde**Presença de Salmonella spp. em cama reutilizada de frangos de corte*

Eduardo Muniz<sup>1</sup>, MV, MSc; Dany Mesa<sup>2\*</sup>, MV; Rocio Cuaspa<sup>1</sup>, Biol; Alexandre M Souza<sup>1</sup>, MV; Elizabeth Santin<sup>1</sup>, MV, MSc, PhD.

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Brasil.

(Received: December 14, 2012; accepted: April 11, 2013)

## Summary

**Background:** reutilization of poultry litter for multiple broiler flocks is a common practice in modern production systems due to the increasing scarcity and cost of bedding materials, and the necessity to reduce environmental impact. However, this practice has been associated with sanitary risks, such as the presence of *Salmonella* spp. in broiler meat. **Objective:** a study was conducted to detect the presence of *Salmonella* spp. in reused litter. **Methods:** 1,280 litter samples from Midwestern Brazilian poultry farms were analyzed during seven consecutive flocks. Samples were collected from flocks aged 28 to 32 days. Disposable shoe covers were used for sample collections. Presence of *Salmonella* spp. was determined by microbiological isolation. During the interval period between flocks the litter was fermented prior to its reuse by covering it with a black plastic canvas for 7 days. **Results:** positive samples for *Salmonella* spp. decreased when the number of litter reuses increased compared with the first reuse of the litter. An anaerobic digestion process with biological and physicochemical changes in the litter material and microbial communities may explain the low survival of pathogenic bacteria such as *Salmonella* spp. **Conclusions:** our study demonstrates that litter reused after the fermentation process is a safe and recommended practice to reduce the presence of *Salmonella* spp.

**Key words:** ammonia, anaerobic digestion, composting, fermentation, microbiota.

## Resumen

**Antecedentes:** la reutilización de la cama de pollos de engorde es una práctica común en el sistema moderno de producción avícola, sustentada por la reducción en el impacto ambiental, escasez de este material y disminución de costos de producción. Sin embargo, esta reutilización se ha asociado con riesgos

<sup>a</sup> To cite this article: Muniz E, Mesa D, Cuaspa R, Souza AM, Santin E. Presence of *Salmonella* spp. in reused broiler litter. Rev Colomb Cienc Pecu 2014; 27:12-17.

\* Corresponding author: Dany Mesa. Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários 1540, Curitiba, Paraná, Brazil. Email: danyd@uael.edu.co

sanitarios, tales como presencia de *Salmonella* spp. en los lotes de pollo. **Objetivo:** se realizó un estudio con el fin de detectar la presencia de *Salmonella* spp. en camas reutilizadas y fermentadas de pollos de engorde pertenecientes a granjas comerciales. **Métodos:** se analizaron 1280 muestras de cama de diversas granjas avícolas ubicadas en el centro oeste de Brasil durante siete lotes consecutivos de pollos. Las muestras de cama fueron tomadas de galpones con aves entre los 28 y 32 días de edad, utilizando palanetas. La presencia de *Salmonella* spp. se determinó mediante aislamiento microbiológico. Durante el intervalo entre lotes, la cama fue fermentada antes de cada reutilización cubriendo la superficie entera de la cama con una lona de plástico negra por siete días. **Resultados:** fue observada una disminución en las muestras positivas para *Salmonella* con la reutilización y fermentación de las camas entre lotes, significativa con respecto al primer reuso. Esto indica que puede estar ocurriendo un proceso de digestión anaeróbica que conduce a que los procesos biológicos y físico-químicos entre el material de la cama y la comunidad microbiana allí presentes, estén afectando la supervivencia de bacterias patógenas como *Salmonella*. **Conclusiones:** nuestro estudio demuestra que la reutilización de la cama es una práctica segura y recomendable cuando se realiza después del proceso de fermentación, debido a que reduce la presencia de *Salmonella* spp.

**Palabras clave:** amoníaco, compostaje, digestión anaeróbica, fermentación, microbiota.

#### Resumo

**Antecedentes:** a reutilização de cama avícola por vários lotes é uma prática moderna do sistema de produção de aves, baseada na redução do impacto ambiental, escassez de este material e diminuição nos custos de produção. Porém, dita prática é associada com riscos sanitários como a presença de patógenos como *Salmonella* spp. nos lotes de frango. **Objetivo:** uma pesquisa foi realizada para detectar a presença de *Salmonella* spp. na cama reutilizada e fermentada de produtores de frango. **Métodos:** foram analisadas 1280 amostras de cama de diferentes produtores do Centro-oeste do Brasil durante sete lotes consecutivos. As amostras de cama foram coletadas com aves na idade entre 28 e 32 dias usando pró-pés descartáveis e a presença de *Salmonella* spp. foi determinada por isolamento bacteriológico. Durante o intervalo dos lotes a cama foi tratada antes da reutilização por meio da cobertura através de uma lona plástica preta em toda a superfície interna do aviário por sete dias. **Resultados:** foi observada uma diminuição no número de amostras positivas de *Salmonella* spp. com a reutilização e fermentação das camas entre os lotes, significativa em relação ao primeiro reuso. Isto indica que o processo de reutilização, seguido de fermentação anaeróbia do material da cama pela comunidade de microrganismos afetou a sobrevivência de bactérias patogênicas como *Salmonella* spp. **Conclusões:** este estudo evidencia que o reuso da cama é seguro e recomendado quando realizado após o processo de fermentação no intervalo do lote, devido a que diminui a presença de *Salmonella* spp.

**Palavras chave:** amônia, compostagem, digestão anaeróbica, fermentação, microbiota.

#### Introduction

Multiple broiler flocks are commonly reared on a single batch of litter in intensive poultry production systems. In these systems, birds are placed into grow-out houses one day after hatching, directly on litter bedding (Volkova *et al.*, 2009). Management and processing is required to decrease the microbial load before reusing the litter (Vizzier Thaxton *et al.*, 2003). With this purpose, fermentation has been proposed as an optimal alternative to ensure the microbiological quality of the litter (Macklin *et al.*,

2006). However, some doubts regarding potential sanitary risks associated to this practice have been also posed.

Many microorganisms in poultry litter originate in bird excrement, including Enterobacteriaceae and other bacteria with zoonotic capacity (Cook *et al.*, 2012; Fries *et al.*, 2005). Continuous exposure to undesirable bacteria from litter can increase contamination of the birds' digestive tract. Even though enterobacteria do not cause health problems in chickens, it may become a human sanitary



problem during slaughtering due to contamination when the carcass accidentally come in contact with contents from infected crop or intestine, compromising food safety and public health (Haapapuro *et al.*, 1997).

Transference of pathogens into the food chain may also occur when litter is applied to soil as an organic fertilizer, resulting in the contamination of fresh produce (Lovanh *et al.*, 2007; Volkova *et al.*, 2009). Contaminated litter can promote pathogen perpetuation from one flock to another when it is reused more than once. For this reason, reuse of litter is not recommended when sanitary episodes have occurred.

Independent of litter destination (reuse for subsequent flocks or used as fertilizer), treatment to reduce or inactivate bacteria is vital for decreasing animal and human health risks. Thus, litter treatment is considered a needful condition in good poultry production practices (Larrison *et al.*, 2010; Pope and Cherry, 2000). Total replacement of the litter after every flock results in considerable

environmental impact due to the high amounts of substrate required (e.g. wood shavings, straw or sawdust) and the destination of this residue in the environment (Pandey and Soupir, 2011; Pote *et al.*, 2011; Watts *et al.*, 2011). Furthermore, changing the litter after every flock represents a significant cost in poultry production.

The purpose of this study was to evaluate the presence of *Salmonella* after fermenting the litter by covering it with a canvas prior to each reuse.

## Materials and methods

### Experiments

A total of 1,280 litter samples from several poultry farms in Midwestern Brazil were analyzed during seven consecutive flocks. The population corresponds to 196 producers.

### Litter management

The procedure performed between flocks (Figure 1) is briefly described as follows:

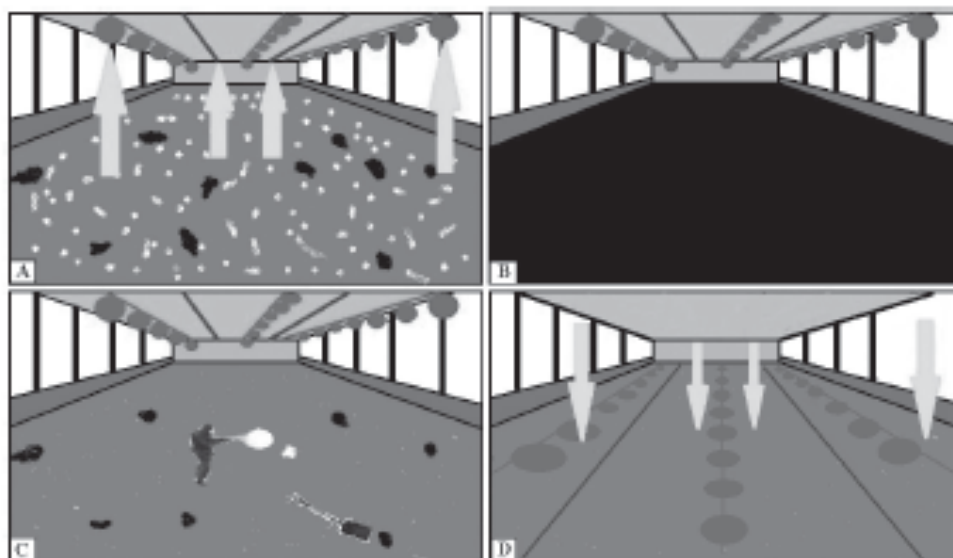


Figure 1. Process used for litter management. A. Poultry house after depopulation. Feathers and crusts can be seen on the litter. Feeders and drinkers are cleaned and raised-up. B. The entire surface of the litter is covered with plastic canvas for seven days. C. Crusts are removed, feathers are burnt with a flame-thrower, and the litter is mixed. Ventilation is provided for two days. D. The litter is ready to receive a new flock.



1. Cleaning and rising of the equipment (feeders, drinkers, etc.) with soap and water immediately following depopulation (Figure 1A).
2. Watering the litter (20 liters/m<sup>2</sup>).
3. All columns inside the shed were covered with plastic canvas (approximately one square meter) to protect them from the fermentation process.
4. Displacing the litter from the shed sides to create a space between the walls and the litter.
5. Covering the litter with plastic canvas avoiding air entrance (Figure 1B).
6. Removing the canvas after seven days of fermentation, discarding the crusts and mixing the litter.
7. Applying the flame-thrower uniformly to the entire surface to burn residue such as feathers (Figure 1C).
8. Ventilating the house for two days before placing the new flock of birds (Figure 1D).

After this process was completed, one-day-old chicks were housed directly on the reused litter.

#### Sample collection

Litter samples were collected when birds were between 28 and 32 days of age. Collectors cleaned their hands carefully before. Plastic boots with shoe cover swabs were used for collection. Collectors walked on the litter for about 10 min, focusing placement of steps between feeders and drinkers, given that these sites maintain a high concentration of animals and therefore a greater amount of feces. The sample was collected on the shoe cover surface in contact with the litter. The shoe cover swabs were placed inside sterile bags containing 1% buffered peptone water solution and stored in cool boxes or coolers with ice while microorganism samples solubilized. Sample bags were sent to laboratory after collection.

#### Laboratory processing

Shoe cover swabs were discarded. Two aliquots of the solution were transferred to selective enrichment broths: 0.5 ± 0.05 mL into 10 mL Tetrathionate Broth and 0.1 ± 0.02 mL into 10 mL Rappaport-Vassiliadis. Both were incubated separately at 35 ± 2 °C and 42

± 2 °C for 18 h and 24 h, respectively, and carefully mixed by vortexing. Then, each culture was streaked both in Brilliant Green agar and MacConkey agar plates using 10 µL inoculum for each. Agar plates were incubated overnight at 35 ± 2 °C and examined for the presence of *Salmonella* spp. colonies (BRASIL, 1995).

#### Statistical analysis

The chi-squared test was used to verify whether the frequency of positive samples for *Salmonella* spp. was related to the number of litter reuses. The criterion for statistical significance was  $p < 0.05$ .

#### Results

Detection of *Salmonella* spp. in litter reused up to seven times is shown in table 1. A decrease in positive samples was observed when comparing the new litter with all subsequent reused litters after the covering process, significant between the first flock with new litter and the second flock with the first reuse.

Table 1. Number of positive and negative samples to *Salmonella* in reused litter.

Number of flocks reusing litter	1	2	3	4	5	6	7	Total
<i>Salmonella</i> positive	43 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	28	28	22	20	11	171
<i>Salmonella</i> negative	164	177	133	163	190	166	116	1109
Total	207	196	161	191	212	186	127	1280

<sup>a</sup> Different letters in the same line indicate statistical difference in Chi-Square ( $p < 0.05$ ).

Besides the observed *Salmonella* reduction and beyond the aim of this report, a noteworthy decrease of darkling beetle (*Alphitobius diaperinus*) infestation was also observed after the covering process. Although it was not measured, we consider this an interesting observation for further studies since the covering and fermentation processes could also eliminate most insects and larvae without requiring the use of chemicals.

#### Discussion

The farms included in this study used the litter-covering method between flocks as a strategy for

poultry waste management. Ammonia concentration increased during the anaerobic digestion and fermentation process that probably occurred. We believe this leads to a microbicidal action in different populations, including *Salmonella* spp. These results are in agreement with Roll et al. (2011) who analyzed the presence of *Salmonella* in reused litters of 14 consecutive flocks and observed a reduction in the presence of *Salmonella* after treatment with lime.

The fermentation process consists of the hydrolysis of complex components, including fats, proteins and polysaccharides, which are broken down by microorganisms to their component subunits with the posterior production of collectable biogases (mainly methane and CO<sub>2</sub>) (Chen et al., 2008; Kelleher et al., 2002). Poultry waste is composed of litter, bird manure, and other residues. Due to high protein and amino acid metabolism, poultry manure is rich in organic nitrogen in the form of urea, which is mostly converted into ammonia by microbial activity, consequently undergoing a nitrification process (i.e. conversion to nitrate) (Kelleher et al., 2002). In this pathway ammonia exists as either a gas (NH<sub>3</sub>) or as ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), which is a hydrophobic, water-soluble and highly permeable molecule to biological membranes.

Ammonia is proposed as an anaerobic digestion inhibitor by the leak of proton-motive forces or interference with the tricarboxylic acid cycle. The first requires both a pH and electron gradient. The second involves the amination of  $\alpha$ -ketoglutarate, an intermediate needed for the metabolism of organic compounds (Chen et al., 2008; Krylova et al., 1997).

Additional abiotic factors should be considered; the temperature reached during fermentation may also play a microbicidal role. The maximum temperature in our study was 60 °C (data not shown). Kim et al. (2012) observed that reduction of *Salmonella* can be achieved by exposing fresh chicken litter to 70 °C for 80.5 to 100.8 min. Wilkinson et al. (2011) reported that *Salmonella typhimurium* in fresh chicken litter was completely

eliminated in 1 h at 55 to 65 °C under laboratory conditions. Other abiotic parameters that regulate microbiological conditions are pH (Payne et al., 2007) and moisture (Eriksson de Rezende et al., 2001). Different litter management and treatment methods can modify those factors (Miles et al., 2011; Torok et al., 2009).

Microorganisms and their complex microbial communities are responsible for most biochemical transformations. Using a combination of culture and molecular detection in intestinal chicken, Lu et al. (2003a) reported that Gram-positive bacteria and proteobacteria were the predominant populations (including *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* and *Streptococcus*) involved in the decomposition of organic material, including wood. This may explain the absence of important animal and human pathogens from the environment. Our study was conducted in Midwestern Brazil. Composition of litter microbiota depends on the geographical region (Cressman et al., 2010) and environmental conditions (Dumas et al., 2011). It should be noted that most of the studies have been conducted in North America.

It has been demonstrated that diversity of intestinal bacterial populations increases as birds age (Lu et al., 2003b). Deposition of excreta onto the litter rapidly alters biotic and abiotic environments simultaneously as litter conditions affect the intestinal microbiota and immune responses (Chapman and Rayavarapu, 2007; Lee et al., 2011). This supports our hypothesis that reusing the litter under proper management conditions may improve intestinal microbiota composition, important for the growth and health of the bird.

In conclusion, by reusing litter we observed a reduction in the presence of *Salmonella* spp., which could contribute to reducing costs and usage of raw litter material. Further studies are needed to evaluate the impact of reusing the litter on the presence of other relevant poultry pathogens such as *Clostridium* and *Eimeria*, as well as its effect on other physical traits, production cost, and its impact on natural resources.

## References

- BRASIL. Método Analítico de Carcasses de Aves e Pesquisa de *Salmonella*. Portaria nº8 de 23 de janeiro de 1995. Brasília. Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) 1995.
- Cook A, Odumetu J, Lee S, Pollari F. *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, verotoxigenic *Escherichia coli*, and *Escherichia coli* prevalence, enumeration, and subtypes on retail chicken breasts with and without skin. *J Food Prot* 2012; 75:34-40.
- Cressman MD, Yu Z, Nelson MC, Moeller SI, Lilburn MS, Zerby HN. Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76:6572-6582.
- Chapman HD, Rayavarapu S. Acquisition of immunity to *Eimeria maxima* in newly hatched chickens reared on new or reused litter. *Avian Pathol* 2007; 36:319-323.
- Chen Y, Cheng J, Creamer K. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour Technol* 2008; 99:4044-4064.
- Dumas MD, Polson SW, Ritter D, Ravel J, Gelb J, Jr, Morgan R, Wommack KE. Impacts of poultry house environment on poultry litter bacterial community composition. *PLoS One* 2011; 6:1-12.
- Eriksson de Rezende CL, Mallinson ET, Gupta A, Joseph SW. *Salmonella* spp. are affected by different levels of water activity in closed microcosms. *J Ind Microbiol Biot* 2001; 26:222-225.
- Fries R, Akcan M, Bandick N, Kobe A. Microflora of two different types of poultry litter. *Br Poult Sci* 2005; 46:668-672.
- Haapapuro ER, Barnard ND, Simon M. Review—animal waste used as livestock feed: dangers to human health. *Prev Med* 1997; 26:599-602.
- Kelleher BP, Leahy JJ, Henihan AM, O'Dwyer TF, Sutton D, Leahy MJ. Advances in poultry litter disposal technology—a review. *Bioresour Technol* 2002; 83:27-36.
- Kim J, Diao J, Shepherd MW, Jr, Singh R, Heringa SD, Gong C, Jiang X. Validating thermal inactivation of *Salmonella* spp. in fresh and aged chicken litter. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78:1302-1307.
- Krylova NI, Khabiboulline RE, Naumova RE, Nagel MA. The influence of ammonium and methods for removal during the anaerobic treatment of poultry manure. *J Chem Technol Biot* 1997; 70:99-105.
- Larlsson EL, Byrd JA, Davis MA. Effects of litter amendments on broiler growth characteristics and *Salmonella* colonization in the crop and cecum. *J Appl Poult Res* 2010; 19:132-136.
- Lee KW, Lillehoj HS, Lee SH, Jang SI, Ritter GD, Bautista DA, Lillehoj EP. Impact of fresh or used litter on the posthatch immune system of commercial broilers. *Avian Dis* 2011; 55:539-544.
- Lovanh N, Cook KL, Rothrock MJ, Miles DM, Sistani K. Spatial shifts in microbial population structure within poultry litter associated with physicochemical properties. *Poult Sci* 2007; 86:1840-1849.
- Lu J, Sanchez S, Hofacre C, Maurer JJ, Harmon BG, Lee MD. Evaluation of broiler litter with reference to the microbial composition as assessed by using 16S rRNA and functional gene markers. *Appl Environ Microbiol* 2003a; 69:901-908.
- Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ, Lee MD. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl Environ Microbiol* 2003b; 69:6816-6824.
- Macklin KS, Hess JB, Bilgili SF, Norton RA. Effects of in-house composting of litter on bacterial levels. *J Appl Poult Res* 2006; 15:531-537.
- Miles DM, Rowe DE, Cathcart TC. High litter moisture content suppresses litter ammonia volatilization. *Poult Sci* 2011; 90:1397-1405.
- Pandey PK, Soupir ML. *Escherichia coli* inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. *AMB Express* 2011; 1:18.
- Payne JB, Osborne JA, Jenkins PK, Sheldon BW. Modeling the growth and death kinetics of salmonella in poultry litter as a function of pH and water activity. *Poult Sci* 2007; 86:191-201.
- Pope MJ, Cherry TE. An evaluation of the presence of pathogens on broilers raised on poultry litter treatment-treated litter. *Poult Sci* 2000; 79:1351-1355.
- Pote DH, Way TR, Kleinman PI, Moore PA, Jr, Meisinger JJ, Sistani KR, Saporito LS, Allen AL, Feyereisen GW. Subsurface application of poultry litter in pasture and no-till soils. *J Environ Qual* 2011; 40:402-411.
- Roll VF, Dai Pra MA, Roll AP. Research on *Salmonella* in broiler litter reused for up to 14 consecutive flocks. *Poult Sci* 2011; 90:2257-2262.
- Torok VA, Hughes RJ, Ophel-Keller K, Ali M, Macalpine R. Influence of different litter materials on cecal microbiota colonization in broiler chickens. *Poult Sci* 2009; 88:2474-2481.
- Vizzler-Thaxton Y, Balzi CL, Tankson JD. Relationship of broiler flock numbers to litter microflora. *J Appl Poult Res* 2003; 12:81-84.
- Volkova VV, Bailey RH, Wills RW. *Salmonella* in broiler litter and properties of soil at farm location. *PLoS One* 2009; 4:e6403.
- Watts DB, Way TR, Torbert HA. Subsurface application of poultry litter and its influence on nutrient losses in runoff water from permanent pastures. *J Environ Qual* 2011; 40:421-430.
- Wilkinson KG, Tee E, Tomkins RB, Hepworth G, Premier R. Effect of heating and aging of poultry litter on the persistence of enteric bacteria. *Poult Sci* 2011; 90:10-18.